



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM BIOTECHNOLOGICKÉHO POTENCIÁLU
BAKTERIE PSEUDOMONAS THERMOTOLERANS**

STUDY ON BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF PSEUDOMONAS THERMOTOLERANS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Vašířová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1410/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kristýna Vašířová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium biotechnologického potenciálu bakterie *Pseudomonas thermotolerans*

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium produkce PHA pomocí *Pseudomonas thermotolerans*
3. Prozkoumat další možné biotechnologické využití bakterie

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristýna Vašířová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit biotechnologický potenciál bakterie *Pseudomonas thermotolerans*. V rámci práce byla prozkoumána schopnost bakterie produkovat polyhydroxyalkanoáty (PHA) a biosurfaktanty. V teoretické části je zpracována charakteristika extremofilních bakterií, PHA a biosurfaktantů. V experimentální části byla bakterie testována na přítomnosti genu, který katalyzuje syntézu mcl-PHA (*phaC1*) pomocí molekulárně biologické metody PCR. Experiment přítomnost tohoto genu potvrdil. Na základě výsledku byly optimalizovány podmínky produkce PHA, jako je výběr ideálního produkčního média, vhodné teploty kultivace a prekursorů. Žádný z testů však schopnost bakterie produkovat PHA nepotvrdil. Dalším z experimentů bylo prozkoumání bakterie na schopnost produkce biosurfaktantů. Testování bylo provedeno ve vhodném minerálním médiu s různými zdroji uhlíku. Prokazatelná produkce biosurfaktantů byla pouze na minerálním médiu s kvasnicovým extraktem a fruktózou. Test tenkovrstvé chromatografie (TLC) poté prokázal, že bakterie produkuje směs monorhamnolipidů a dirhamnolipidů. Větší podíl představují dirhamnolipidy.

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis was to evaluate biotechnological potential of the bacterium *Pseudomonas thermotolerans*. The ability of bacterium to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) and biosurfactants was examined. Theoretical part deals with characteristic of extremophilic bacteria, PHA and biosurfactants. In the experimental part, the bacterium was tested for the presence of gene that catalyzes the synthesis of mcl-PHA (*phaC1*), using molecular technique PCR. Presence of the gene was confirmed by the experiment. Based on the result, PHA production conditions were optimized, such as selection of ideal media for production, suitable cultivation temperature and precursors. However, none of the tests confirmed the ability of production. Another of the experiments was to examine the bacterium's ability to produce biosurfactants. Testing was realized in a suitable mineral medium with different carbon sources. Demonstrable production of biosurfactants was only on mineral medium supplemented by yeast extract and fructose. The thin layer chromatography (TLC) demonstrated, that the bacterium produces a mixture of monorhamnolipids and dirhamnolipids. However, higher portion is represented by dirhamnolipids.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, biosurfaktanty, extremofilní mikroorganismy, *Pseudomonas thermotolerans*, rhamnolipidy

KEY WORDS

Polyhydroxyalkanoate, biosurfactants, extremophilic microorganisms, *Pseudomonas thermotolerans*, rhamnolipids

VAŠÍŘOVÁ, K. *Studium biotechnologického potenciálu bakterie Pseudomonas thermotolerans*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019. 45 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za odborné vedení, vstřícnost a hlavně trpělivost. Mé poděkování také patří mému konzultantovi Ing. Danu Kučerovi za cenné připomínky při úpravě práce, pomoc při práci v laboratoři a shovívavost. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ivě Pernicové, Ing. Ivaně Nováčkové a Ing. Olze Kratochvílové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Extremofilní organismy	9
2.2 Termofilní bakterie	9
2.2.1 Stanoviště termofilních bakterií	9
2.2.1.1 Geotermální a sopečné oblasti	10
2.2.1.2 Hlubokomořské hydrotermální průduchy	11
2.2.1.3 Geotermálně vyhřívané ropné pole	11
2.2.1.4 Solárně vyhřívané půdy a sedimenty	11
2.2.2 Fyziologické aspekty	11
2.2.2.1 Molekulární mechanismy	11
2.2.2.2 Metabolismus	12
2.3 <i>Pseudomonas thermotolerans</i>	12
2.4 Polyhydroxyalkanoáty	13
2.4.1 Struktura a vlastnosti	13
2.4.2 MCL-PHA	14
2.4.3 Biosyntéza PHA	14
2.4.4 Biodegradace PHA	15
2.4.5 Aplikace PHA	16
2.4.5.1 Aplikace ve zdravotnictví	16
2.4.5.2 Aplikace v nanotechnologiích	16
2.5 Biosurfaktanty	17
2.5.1 Struktura biosurfaktantů	17
2.5.2 Rozdělení biosurfaktantů	17
2.5.2.1 Glykolipidy	17
2.5.2.2 Lipopeptidy	18
2.5.3 Biotechnologická aplikace biosurfaktantů	18
2.5.3.1 Regenerace ropy	18
2.5.3.2 Aplikace v medicíně	19
2.5.3.3 Využití biosurfaktantů v potravinářství	19

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje.....	20
3.1.1 Použité bakterie	20
3.1.2 Použité chemikálie.....	20
3.1.3 Použité přístroje	21
3.2 Kultivace bakterií	21
3.2.1 Příprava inokulačního média	21
3.2.2 Příprava produkčních médií.....	22
3.3 Příprava roztoků	23
3.3.1 Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu	23
3.3.2 Příprava lyzačního pufru.....	23
3.3.3 Příprava agarózového gelu pro elektroforézu	23
3.3.4 Příprava vyvíjecí směsi pro tenkovrstvou chromatografii.....	23
3.3.5 Detekční činidlo	23
3.4 Použité metody	24
3.4.1 Izolace bakteriální DNA	24
3.4.2 Stanovení čistoty DNA pomocí spektrofotometru	24
3.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	24
3.4.3.1 Příprava vzorků pro PCR	24
3.4.3.2 Stanovení PCR amplikonů pomocí gelové elektroforézy	25
3.4.4 Stanovení biomasy.....	25
3.4.5 Stanovení obsahu PHA	25
3.4.5.1 Stanovení obsahu PHA v biomase	25
3.4.5.2 Stanovení kalibrační křivky pro plynovou chromatografii	26
3.4.6 Stanovení utilizace vybraných substrátů	26
3.4.7 Stanovení biosurfaktantů	26
3.4.7.1 Stanovení aktivity emulze	26
3.4.7.2 Solubilizace krystalického antracenu	27
3.4.7.3 Stanovení biosurfaktantů metodou Du-Nouy-Ring	27
3.4.7.4 Chromatografie na tenké vrstvě	27
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1 Schopnost bakterie produkovat PHA	28
4.2 Optimalizace podmínek produkce	29

4.2.1	Výběr minerálního média	29
4.2.2	Výběr optimální teploty růstu	30
4.2.3	Přidávání prekurzorů pro produkci PHA	30
4.2.4	Přidávání prekurzoru v různém čase	32
4.2.5	Stanovení utilizace vybraných substrátů	33
4.3	Produkce biosurfaktantů	34
4.3.1	Stanovení emulgační aktivity	34
4.3.2	Solubilizace antracenu	36
4.3.3	Metoda Du-Nouy-Ring	36
4.3.4	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	37
5	ZÁVĚR	39
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	45

1 ÚVOD

Bakterie patří mezi důležitý článek moderních biotechnologií, avšak práce s některými z nich vyžaduje vysoké nároky na prostředí. Řešením tohoto problému může být použití bakterií extrémofilních, které jsou odolnější vůči vnějším vlivům. *Pseudomonas thermotolerans* je termofilní bakterie s předpoklady pro využití v biotechnologiích, a to konkrétně při produkci polyhydroxyalkanoátů a biosurfaktantů.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolyestery 3-hydroxyalkanových kyselin, produkované různými druhy mikroorganismů. Díky svým vlastnostem jsou možnou alternativou nahrazení petrochemicky vyráběných plastů, které jsou hojně užívaným materiálem v lidském každodenním životě. Problémem těchto plastů je jejich výroba z neobnovitelných zdrojů a dopad na životní prostředí kvůli dlouhému času rozkladu. Polyhydroxyalkanoáty jsou biologickou alternativou a jejich hlavní pozitivum spočívá právě v biodegradabilitě a biokompatibilitě. Rozklad těchto polymerů je v rozmezí několika týdnů až měsíců, což je oproti průmyslově vyráběným plastům, jejichž doba rozkladu je desítky až stovky let, velký rozdíl.

Surfaktanty jsou povrchově aktivní látky užívané již více než 4 000 let. Dříve se však používaly pouze k lékařským účelům a jako čisticí prostředky se začaly používat mnohem později. Jedná se o látky snižující povrchové napětí a tvořící micely v rozpouštědlech. Průmyslově se vyrábějí petrochemicky z ropy, ovšem tyto látky jsou toxické. V dnešní době se posouvá výzkum směrem k povrchově aktivním látkám šetrnějším k životnímu prostředí. Touto alternativou mohou být mikrobiálně produkované biosurfaktanty. Jedná se o látky biodegradabilní, málo toxické a schopné funkce v široké rozmanitosti vlivů vnějšího prostředí (teplota, pH).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Extremofilní organismy

Organismy, kterým se daří v extrémních stanovištích, jež jsou pro jiné formy života nesnesitelně nepřátelské, nebo dokonce smrtící, nazýváme extremofily. Mezi tyto organismy patří primárně prokaryota (archea a bakterie) s několika příklady eukaryot. Extremofily jsou definovány podmínkami prostředí, ve kterých optimálně rostou. Mohou být popsány jako organismy acidofilní (organismy jejichž optimum je při nízkém pH), halofilní (organismy, které vyžadují přítomnost solí), termofilní (organismy rostoucí při vysokých teplotách), barofilní (organismy, které nejlépe rostou za vysokého tlaku), psychofilní (rostoucí za nízkých teplot) a alkalofilní (organismy rostoucí za vysokého pH). Díky jejich rozmanitosti mohou naznačovat rozsah podmínek, za kterých je život možný [1, 2].

2.2 Termofilní bakterie

Teplota vytváří řadu výzev, od strukturní devastace způsobené tvorbou ledových krystalů v jednom extrému po denaturaci biomolekul a buněčných složek na straně druhé. Byla však objevena celá řada mikroorganismů, které mohou tyto problémy překonat. Jednu takovou skupinu organismů zahrnují termofily. Slovo „thermophile“ bylo odvozené ze dvou řeckých slov „thermotita“ (teplo) a „philia“ (láska). Termofilní organismy jsou teplomilné organismy, které nejen tolerují vysoké teploty, ale obvykle je vyžadují pro svůj růst a přežití. Termofil je definován jako organismus, který může žít při teplotním maximu, nebo hodnotě jeho blízké pro taxonomickou skupinu jejíž je součástí. Práví termofilové jsou ti, kteří rostou při teplotách nad maximální teplotou pro většinu bakterií, zejména pak patogenů. Maximální teplota růstu patogenů je asi 37,5 °C. Právě termofily nevykazují růst, nebo pouze slabý růst při teplotách nižších 40 °C. Jejich vývoj vyžaduje teploty nad 45 °C a některé jsou schopné vyvinout se i při teplotě 80 °C, i když tyto bakterie mívají nejvýraznější růst v rozmezí 60 °C až 70 °C [3, 4].

Termofilní organismy jsou podle snášenlivosti teploty zařazeny do skupin. První skupinou jsou mírní termofilové, jejichž teplotní optimum je při 40–60 °C. Mezi zástupce této skupiny patří např. *Tepidibacter*, *Clostridium* či *Exiguobacterium*. Další skupinou jsou extrémní termofilové, jejichž teplotní optimum se nachází v rozmezí 60–80 °C a mezi zástupce patří např. *Thermococcus*, *Palaeococcus* nebo *Thermaerobacter*. Poslední skupinou jsou hypertermofilové, jejichž teplotní optimum se nachází nad 85 °C a mezi zástupce patří např. *Pyrococcus*, *Archaeoglobus* nebo *Ignicoccus* [3].

V současné době je známý horní teplotní limit pro život 121 °C. Tato teplota odpovídá maximu pro růst a přežití nefotosyntetizujících prokaryot. Fotosyntetizující prokaryota nejsou schopna růstu při takto vysokých teplotách a jejich horní teplotní limit je 73 °C. Termofilní prokaryota jsou známa již 100 let, zatímco hypertermofilní prokaryota byla charakterizována teprve před třemi desítkami let. Horní teplotní limit pro eukaryotické organismy je ještě nižší, a to přibližně 62 °C [3].

2.2.1 Stanoviště termofilních bakterií

Biotopy, kde se nacházejí termofilní bakterie, by měly být pro biotechnologicky zajímavými místy výzkumu. I v dnešní době je stále běžnou praxí v exotických půdách hledat a nalézat nové

mikroorganismy produkující antibiotika. Stejně tak čekají na objevení nové druhy termofilních bakterií s významnými průmyslovými aplikacemi. Ačkoliv paleta přírodních stanovišť s vysokou teplotou není tak rozšířena jako mírné biotopy, přece jen se na naší planetě nachází. Tato prostředí mohou být jak zemského, tak mořského původu. K teplým místům patří četné typy sopečných a geotermálních prvků (Obr. 1), jejichž teplota je často vyšší než teplota bodu varu vody, prostředí ohřívané sluncem, sedimenty s teplotami dosahujícími 70 °C nebo biologicky samo-ohřevná prostředí jako je kompost. Vlastnosti organismů značně usnadňují ekologické studie o produktivitě, kolísání populace a interakce druhů. Druhovou diverzitu však ovlivňují i další parametry jako je pH, dostupné zdroje energie, iontová síla a živiny [3, 5].



Obr. 1: Geotermálně vyhřívané naleziště termofilních organismů [5]

2.2.1.1 Geotermální a sopečné oblasti

Geotermální a sopečné oblasti se sdružují především s tektonicky aktivními zónami, kde dochází k velkým pohybům zemské kůry. Hluboko uložené magma se dostává blíže k zemskému povrchu a je zdrojem tepla. Podzemní voda je díky tomuto teplu ohřívána, ale důsledkem litostatického tlaku nedochází k jejímu vření. Tato voda poté stoupá zpět na povrch Země a vede ke vzniku horkých pramenů či gejzírů. V sopečných oblastech mohou také vznikat fumaroly, což jsou parní otvory v zemské kůře, ze kterých stoupá pára a různé plyny jako oxid uhličitý, oxid siřičitý, chlorovodík a vodík. Fumarol, emitující sirné plyny se poté nazývá solfatara. Takováto horká prostředí s velkým obsahem síry se nacházejí na celém světě, včetně Itálie, Islandu, Nového Zélandu nebo Yellowstonekého národního parku. Uvedené lokality jsou kolonizovány různými druhy acidofilních mírných a extrémních termofilů [3, 6].

Další oblastí výskytu termofilních bakterií jsou zemské horské prameny. Voda z těchto pramenů může být vyhřívána jak geotermálním teplem, tak přímým kontaktem s magmatem. Voda se dostává na povrch pomocí pórů v zemské kůře a tím se v ní rozpouští minerály obsažené v půdě. Horké prameny se staly z ekologického hlediska fascinujícími, protože plochy velkých rozměrů mají výrazný tepelný gradient. Kombinace nepřetržité dodávky živin a vysoká intenzita světla vede k tvorbě mikrobiálních biofilmů, které představují těsně interagující společenství mikroorganismů [3].

2.2.1.2 Hlubokomořské hydrotermální průduchy

Hlubokomořské hydrotermální průduchy a jejich fauna byly objeveny roku 1977. Poprvé byl objeven ekosystém zcela založený na primární produkci dosahované chemosyntetickými bakteriemi. Jedná se o průduchy v zemské kůře, ze kterých vyvěrá geotermálně ohřátá voda. Hydrotermální prameny vyvěrající z průduchů mají teplotu 400 °C a jsou obohaceny o přechodné kovy. Promíchání těchto hydrotermálních tekutin s mořskou vodou způsobuje změnu pH. V závislosti na množství míchání mohou mít tyto vody různé fyzikálně-chemické složení. Průduchy se nachází v hloubce 800–3500 m, což odpovídá hydrostatickému tlaku 80–350 barů. V okolí zmiňovaných průduchů se nachází ostrovy biologicky různorodých prokaryotických a eukaryotických společenství. Tato společenství zahrnují organismy s metabolismem založeným na chemosyntéze a s rychlostí růstu srovnatelnou s organismy mělkých vod [3, 7].

2.2.1.3 Geotermálně vyhřívané ropné pole

Ropných polí se vyskytuje na naší planetě více než 40 000. Díky neustálému koloběhu ropy a zaplavování vodou jsou tato pole jedním z významných geologických prostředí pro růst mikroorganismů. Pole se nachází ve velké podpovrchové hloubce a vyznačují se vysokou teplotou. Tyto geotermálně vyhřívané nádrže tak tvoří naprosto unikátní biotopy poskytující vhodné podmínky pro růst termofilních organismů, které přitáhly velký zájem badatelů se snahou o jejich izolaci [8].

2.2.1.4 Solárně vyhřívané půdy a sedimenty

Z půd a sedimentů vyhřívaných slunečním zářením bylo izolováno velké množství termofilních bakterií a plísní. Existuje více než 200 identifikovaných bakteriálních rodů a jeden vzorek půdy může obsahovat více než 2 000 geneticky odlišných bakterií. Široký výskyt termofilních bakterií, hub, kvasinek a plísní je především v půdách vyhřívaných na teplotu 70 °C. Mezi bakterie nalezené v půdě patří např. rody *Bacillus*, *Clostridium* a *Thermoactinomyces* [3, 9].

2.2.2 Fyziologické aspekty

2.2.2.1 Molekulární mechanismy

Odpovědi na to, proč termofilní bakterie prospívají při extrémních teplotách, které zabíjejí jiné formy života, jsou poskytovány vyšetřením základů pro stabilizaci biomolekul při vysokých teplotách. Byly popsány dva molekulární mechanismy, které jsou jedinečné pro extrémní termofily, ukazující vnitřní rozdíl v makromolekulární struktuře a v přítomnosti tepelně stabilních kofaktorů [5]. Hlavním parametrem je stabilita proteinů, nukleových kyselin a tuků při vysoké teplotě [10].

Extrémní termofily produkují unikátní polyaminy, termin a termospermin, které slouží ke stabilizaci aparátu syntetizujícího proteiny a pro ochranu makromolekul před vysokou teplotou. Membránové lipidy extrémních termofilů obsahují více nasycených masných kyselin, a to poskytuje správný stupeň tekutosti potřebný pro funkci membrány. Nukleové kyseliny u mezofilů i termofilů mají vlastní strukturu, která zajišťuje vysokou tepelnou stabilitu. Tepelná stabilita je závislá na počtu interakcí iontových a vodíkových vazeb, a to tak, že se zvýšením počtu těchto vazeb stoupá stabilita [5].

2.2.2.2 *Metabolismus*

V současné době je známo více než 200 druhů termofilů a hypertermofilů, kteří patří do přibližně 100 rodů. Tyto mikroorganismy mohou provádět celou řadu metabolických procesů, které zahrnují množství elektronových donorů a akceptorů. Ačkoliv metabolické dráhy používané termofily a hypertermofily nejsou stále do značné míry vyřešeny, je zřejmých několik dominantních charakteristik redoxních reakcí poskytujících energii. Mezi obvyklé akceptory elektronů patří např. síran, dusičnan, oxid uhličitý a železo. Většina známých termofilů je obligátně heterotrofní a užívají směsi polypeptidů nebo sacharidů jako zdroj energie a uhlíku. Jiní jsou striktně autotrofní, ti jsou stimulováni oxidem uhličitým a další jsou schopni růst jak autotrofně, tak heterotrofně v závislosti na zdroji uhlíku [11].

Termofilní bakterie mají všechny vlastnosti, které se normálně nacházejí v mezofilních bakteriích, přičemž hlavní rozdíl je v tom, že se jedná o specifické molekulární mechanismy, které zohledňují biologickou stabilitu a aktivitu při vysoké teplotě. Substráty katabolizované termofily zahrnují běžné biopolymery, cukry, polypeptidy, aminokyseliny, alkoholy, karboxylové kyseliny, uhlovodíky, aromáty, oxid uhelnatý a anorganické látky. Koncové produkty některých anaerobních bakterií zahrnují také ethanol, kyselinu octovou, kyselinu mléčnou, kyselinu máselnou, metan, vodík a oxid uhličitý [5].

2.3 *Pseudomonas thermotolerans*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou považované za významné a technologicky důležité organismy. Jsou všudypřítomné, vyskytují se v nejrozličnějších řadách ekosystémů a představují jednu z nejvíce divergentních skupin z hlediska jejich metabolické všestrannosti. Jedná se o gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru s jedním nebo více polárními bičíky sloužícími pro pohyb. Ukázka vzhledu bakterie je zobrazena na Obr. 2. Bakterie rodu *Pseudomonas* tvoří spory a jsou kataláza-pozitivní. Většina pseudomonád je schopna tvořit biofilmy vylučováním polysacharidů do okolí buněk. Díky jejich gramnegativnímu charakteru jsou přirozeně odolnější vůči antibiotikům [12].

Současné studie popisují středně termotolerantní bakterii, která byla izolována z varné vody korkové továrny v Portugalsku. Teplota vody dosahovala 50 °C a kultura byla obohacená o hexadekan. *Pseudomonas thermotolerans* je sbírková bakterie s označením DSM 14292. Bakterie má rozmezí růstu od 25 °C až po 56 °C. Optimální růstová teplota je stanovena na 45 °C. Rozmezí růstu pH se nachází mezi 6–10. Jedná se o bakterii s biotechnologickým potenciálem díky záznamům o produkci polyhydroxyalkanoátů, se střední délkou uhlíkového řetězce a biosurfaktantů [13].



Obr. 2: Ukázka bakterie rodu *Pseudomonas* [14]

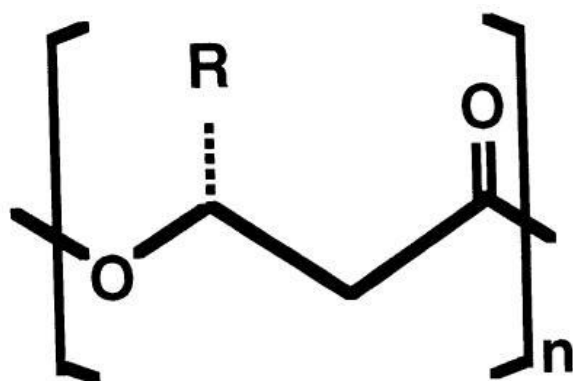
2.4 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biopolyestery hydroxykyselin. Jedná se o intracelulární granule uložené v buněčné cytoplazmě jako zdroj uhlíku a zásobní materiál pro skladování energie různými mikroorganismy. Většina bakterií akumuluje PHA, které tvoří až 90 % suché hmoty, když je zdroj uhlíku poskytnut v nadbytku a jiný nutriční prvek, jako dusík, je v omezeném množství. Vzhledem ke své biokompatibilitě a biologické rozlišnosti mají PHA široké spektrum aplikací v různých odvětvích. PHA jsou zelené plasty a mají pozitivní sociální a environmentální dopad ve srovnání s konvenčními plasty z hlediska výroby a recyklace. PHA navíc nemají při použití *in vivo* akutní ani chronické účinky na lidské zdraví. Tyto bioplasty představují obnovitelnou a udržitelnou alternativu se současným snížením požadavků na skládky [15, 16, 17].

Významný zájem je o to, že se PHA může sestávat z různých hydroxyalkanoátových monomerů. Výsledkem je produkce PHA s různými fyzikálními vlastnostmi či rychlostí degradace, která se dá ovlivnit změnou bakterie nebo změnou fermentačních podmínek. Obchodní zájem přitahují tyto polymery zejména kvůli jejich pozoruhodným podobnostem ve fyzikálních vlastnostech se syntetickými polymery jako je polypropylen [15, 17].

2.4.1 Struktura a vlastnosti

PHA jsou primárně lineární polyestery [18]. Monomerní podjednotky se vyskytují ve formě 3-hydroxy-substituovaných kyselin. Všechny kyseliny se nachází v *R*-konfiguraci v důsledku stereospecifity polymeračního enzymu PHA syntázy až na několik málo zvláštních případů [15]. Karboxylová skupina v jednom z monomerů tvoří v těchto polymerech esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru. Poloha hydroxylové skupiny je do značné míry variabilní a již byly začleněny 4-, 5-, a 6-hydroxykyseliny. Podle délky řetězce se PHA obecně rozdělují na PHA s krátkým bočním řetězcem (scl-PHA), které obsahují monomery o délce 3–5 atomů uhlíku, a na PHA se středně dlouhým bočním řetězcem (mcl-PHA), které jsou tvořeny monomery o 6–14 atomech uhlíku [18]. Obecný vzorec polyhydroxyalkanoátu je zobrazen na Obr. 3.



Obr. 3: Obecný vzorec polyhydroxyalkanoátů [18]

Molekulová hmotnost PHA se obecně pohybuje v rozmezí 50 000–1 000 000 Da. Tato hodnota se mění v závislosti na typu producenta. Historicky byl nejrozsáhleji studován polyester poly(3-hydroxybutyrát) (PHB). Jedná se o nejběžnější typ PHA a schopnost bakterií hromadit tento polyester je často používána jako taxonomická charakteristika. V buňce existuje PHB v „tekutém“ amorfním stavu. Po extrakci z buňky pomocí organických rozpouštědel se stává polymer vysoce krystalickým a v tomto stavu je tuhý, avšak velice křehký. Vzhledem k této křehkosti není velmi odolným materiálem vůči namáhání. Teplota tání PHB je kolem 180 °C. Při teplotě 200 °C se polymer teplotně rozkládá a omezuje tak schopnost dalšího zpracování homopolymeru. Kopolymery PHB mohou vést ke vzniku polymerů obsahujících monomery 3-hydroxyvalerátu nebo 4-hydroxybutyrátu. Začleněním 3-hydroxyvalerátu vzniká kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), který má oproti vlastnostem samotného PHB nižší krystalinitu, a tím pádem menší tuhost a vyšší elasticitu [15, 18].

2.4.2 MCL-PHA

Polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce (mcl-PHA) jsou polyestery produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas*. Ve svých podjednotkách obsahují 6 až 14 atomů uhlíku a mají pro spotřebitele atraktivní vlastnosti, jako jsou nízké teploty tání, vysoká elasticita a biologická odbouratelnost. Díky těmto vlastnostem vznikly návrhy na použití uvedených polymerů v nátěrových hmotách a jiných povlacích, ve sloučeninách s řízeným odbouráváním a v tkáňovém inženýrství. Polymery mohou být také depolymerizovány na chirální monomery, které se potenciálně mohou využít při syntéze antibiotik, vitamínů a dalších bioaktivních sloučenin [18, 19].

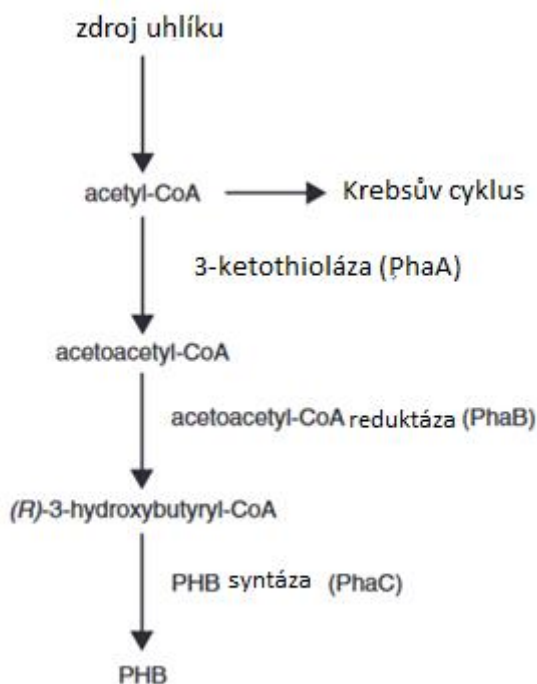
2.4.3 Biosyntéza PHA

Příroda vyvinula několik různých cest pro tvorbu PHA, z nich každá z nich je využívána řadou organismů produkujících PHA. Biosyntéza PHA může probíhat u čistých či směsných kultur a probíhá biologickou cestou. Bakterie pravděpodobně začne produkovat PHA, jestliže se nachází ve stresujících podmínkách, kdy tento polymer slouží jako zásobní zdroj uhlíku [15, 18, 20].

V dnešní době již víme, že enzym PHA syntáza vykazuje širokou substrátovou specifitu, a proto lze polymerovat širokou škálu monomerů. Jedním z faktorů, které určují typ složek PHA je výchozí zdroj uhlíku pro tvorbu. Jako takovýto zdroj může sloužit celá řada substrátů např. fosilní zdroje jako methan, hnědé a černé uhlí, obnovitelné zdroje jako sacharosa a celulóza,

vedlejší průmyslové produkty jako melasa a syrovátka, organické kyseliny jako kyselina propionová, anebo i oxid uhličitý [20]. K hromadění PHB v buňce bakterie nejčastěji dochází ve chvíli, kdy je v nadbytku jeden ze zdrojů uhlíku, a přitom je nedostatek některé z ostatních živin. Limitující složkou může být dusík, síra, fosfor, železo, hořčík nebo draslík. Biosyntéza PHA pomocí bakterií může být rozdělena do dvou hlavních typů na základě složení monomeru. *Cupriavidus necator* představuje jednu skupinu, zatímco *Pseudomonas* představují další hlavní typ biosyntézy PHA [21].

PHA biosyntetické dráhy (Obr. 4) jsou složitě spojeny s centrálními metabolickými drahami bakterie včetně glykolýzy, Krebsova cyklu, β -oxidace, Calvinova cyklu a jiných [22]. Nejzákladnější biosyntetická dráha PHA začíná kondenzací dvou molekul acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA působením 3-keto thiolázy, která je kódován *phaA* genem. Produkt poté podléhá redukci reduktázou NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenázou, kódovanou *phaB* genem. Následně dochází k polymeraci (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA na PHB působením PHB polymerázy kódované *phaC* genem, přičemž je koenzym A uvolněn. Geny *phaA*, *phaB* a *phaC* jsou seskupeny v jednom operonu *phaCAB* [15, 22].



Obr. 4: Biosyntetická dráha PHA [22]

V biosyntéze PHA reprezentované pseudomonádami je možné syntetizovat mcl-PHA z různých alkanů, alkynů nebo alkanoátů. Na rozdíl od *C. necator* většina pseudomonád nesyntetizuje scl-PHA. Bakterie v této skupině vycházejí z 3-hydroxyacyl-CoA [15].

2.4.4 Biodegradace PHA

Jednou z nejdůležitějších vlastností polyhydroxyalkanoátů v oboru biotechnologií je jejich biologická rozložitelnost. Mikroorganismy v přírodě jsou schopny degradovat PHA pomocí PHA hydroláz a PHA depolymeráz, které hydrolyzují polymer extracelulárně na oligomery

a monomery rozpustné ve vodě, a následně využívat tyto monomery jako živiny. V závislosti na složení polymeru (krystalinita, přísady, plocha povrchu) a okolních podmínkách (teplota, vlhkost, pH a přísun živin) se může účinnost těchto enzymů měnit. Rychlost degradace kusu PHB je pro anaerobní mikroorganismy např. v kompostu v řádu několika měsíců a v mořské vodě je rozložitelnost v řádech let. PHA jsou biokompatibilní což znamená, že nemají toxický účinek na živé organismy. U savců se tento polymer hydrolyzuje pomalu, a to, v závislosti na jeho složení, asi 1 až 6 % za 6 měsíců [15, 22, 23].

2.4.5 Aplikace PHA

Vzhledem k biokompatibilitě těchto polymerů a jejich výhodným vlastnostem jsou PHA široce využívány v mnoha oblastech. Mohou být použity kupříkladu jako biopaliva, jako náhrada petrochemických plastů pro výrobu lahví, nebo v dnešní době se jejich uplatnění nejde také v medicíně či v nanotechnologiích [24].

2.4.5.1 Aplikace ve zdravotnictví

První z aplikací ve zdravotnictví představuje tkáňové inženýrství. PHB a kopolymer PHBV mohou být použity jako matrice pro *in vitro* poliferační různých lidských buněk. Tyto materiály tedy mohou být pro dané aplikace využity. PHB také byl testován za účelem výměny tvrdé tkáně jako je třeba tkáň kostní, a také pro tkáňové inženýrství srdečních chlopní. Bylo také popsáno, že PHBV mikrosféry podporují primární neurony, které se používají v tkáňovém inženýrství neuronů [25].

Dalším způsobem využití polyhydroxyalkanoátů ve zdravotnictví jsou bio-implantátové náplasti. Biokompatibilní povaha, nízká zánětlivá odpověď, biologická rozložitelnost a použití při regeneraci tkání, to vše dává dobré vlastnosti PHA k využití právě jako náplasti [24].

Nosič pro podávání léčiv, i to může být jedno z využití PHA ve zdravotnictví. Mikro a nanosféry PHA jsou využívány jako polymery, které mohou zastávat funkci vnějšího pláště, uvnitř něhož je léčivo, které je postupně uvolňováno s degradací PHA v těle živočicha. PHA již takto byly testovány jako nosiče léku či vakcín u myši, ovcí, psů, králíků, koček, a dokonce i u lidí při léčbě gingivitidy [26].

Jedním z posledních příkladů využití polyhydroxyalkanoátů ve zdravotnictví je jejich chirurgická aplikace, kdy PHA mohou být využity k opravě poraněných nervů kvůli jejich piezoelektrickému charakteru, dále jako resorbovatelné chirurgické nitě nebo ke krytí ran [24].

2.4.5.2 Aplikace v nanotechnologiích

Nanotechnologie je jednou z nejrozšířenějších oblastí vědy s širokým spektrem využití. V lékařských vědách se otevřely obzory díky kontrole hmoty v malém měřítku. Aplikace nanotechnologií je zejména ve vývoji proteinových čípků s využitím právě PHA pro selektivní imobilizaci proteinu, užívané pro specifickou detekci hepatitidy B. PHA se také používají pro tvorbu tenkých nanogelů. Nanočástice jsou preferovány oproti částicím větší velikosti, zejména v lékařství a farmacii, kvůli rychlé absorpci a rychlému pohybu směrem k cíli [24].

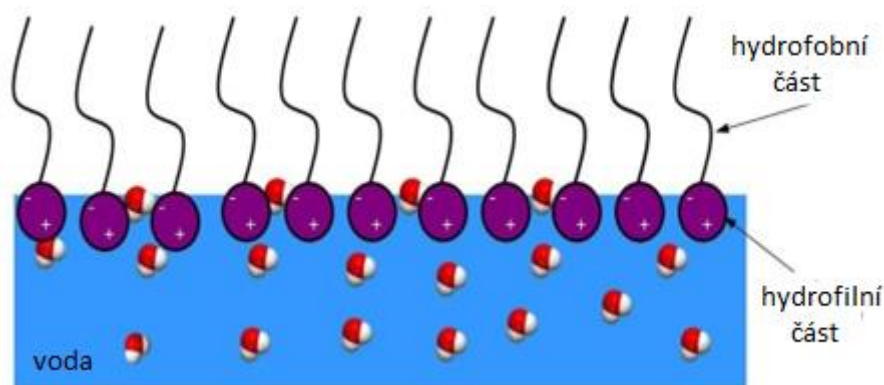
2.5 Biosurfaktanty

Surfaktanty neboli povrchově aktivní látky, jsou známy již od starověku. Nejstarší záznam o výrobě mýdla pochází z Babylonské říše 2 800 let před naším letopočtem [27]. Toto mýdlo vyrobené ze zvířecího tuku a popela však bylo používáno pouze pro lékařské účely a jako čistící prostředek se začalo užívat až v 2. století našeho letopočtu. Jedná se o povrchově aktivní činidla snižující povrchové napětí a tvořící micely v rozpouštědlech. Molekuly surfaktantů jsou tvořeny hydrofilními i hydrofobními skupinami, které se rozdělují mezi rozhraními s různým stupněm polaritity a vodíkovými můstky, jako jsou rozhraní olej/voda nebo vzduch/voda, a působí zde jako emulgační nebo pěnicí činidla [28] .

Surfaktanty dělíme do dvou skupin: syntetické povrchově aktivní látky, získané z petrochemických a oleochemických zdrojů, a biosurfaktanty. Během posledních let je pozorován posun směrem k povrchově aktivním látkám, které jsou šetrnější kvůli možnému nepříznivému vlivu povrchově aktivních látek na životní prostředí. Vhodnou alternativou jsou biosurfaktanty vyrobené mikroorganismy z obnovitelných zdrojů, např. bakteriemi rodu *Pseudomonas* [27].

2.5.1 Struktura biosurfaktantů

Jedná se amfipatické sloučeniny s hydrofilními a hydrofobními skupinami (Obr. 5). Hydrofobní skupina může být protein nebo peptid s vysokým podílem hydrofobních postranních řetězců, nebo uhlovodíkový řetězec mastné kyseliny s 10 až 18 atomy uhlíku. Hydrofilní skupina může být esterová, hydroxylová, fosfátová, karboxylová nebo cukr. Molekulová hmotnost biosurfaktantů je mezi 500–1 500 Da a obecně se řadí mezi látky s nízkou molekulovou hmotností. Většina biosurfaktantů má neutrální nebo záporný náboj, jen některé mají kladný [29].



Obr. 5: Struktura biosurfaktantů na rozhraní vody a vzduchu [30]

2.5.2 Rozdělení biosurfaktantů

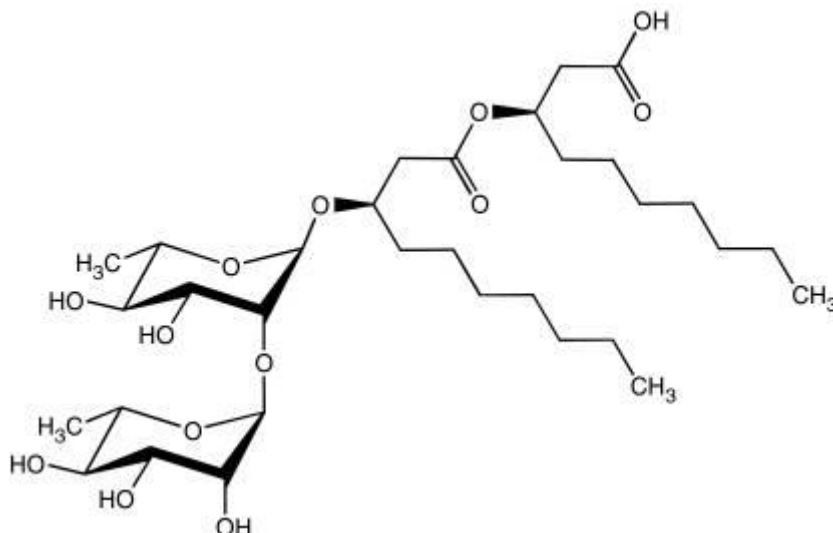
V dnešní době se za ekonomicky a průmyslově významné považují dvě třídy biosurfaktantů. Jedná se o glykolipidy a lipopeptidy, biosurfaktanty s nízkou molekulovou hmotností [27].

2.5.2.1 Glykolipidy

Glykolipidy jsou složeny z hydrofobní části, která je tvořena mastnou kyselinou s dlouhým řetězcem a tato kyselina může být alifatická, hydroxylová či nenasycená. Hydrofilní část těchto

molekul je tvořena sacharidem. Mezi nejznámější glykolipidy patří sophorolipidy a rhamnolipidy, které jsou produkovány rodem *Pseudomonas* [31, 32].

Rhamnolipidy patří mezi doposud nejvíce studované glykolipidy. Jsou složeny z jedné, nebo dvou molekul L-ramnózy, vázaných na monomer nebo dimer β -hydroxy mastných kyselin, jak je možné vidět na Obr. 6. Rhamnolipidy jsou produkovány několika druhy pseudomonád, přičemž nejlepším producentem je *Pseudomonas aeruginosa* [27, 31, 32].



Obr. 6: Chemická struktura rhamnolipidů [36]

Sophorolipidy jsou dalším dobře studovaným typem glykolipidů. Jsou produkovány určitými kmeny kvasinek jako například *Candida batistae*. Sophorolipidy jsou tvořeny molekulou sophorózy spojenou s terminální nebo sub-terminální hydroxylovou mastnou kyselinou prostřednictvím glykosidové vazby [27, 32].

2.5.2.2 Lipopeptidy

Několik druhů mikroorganismů, jako je *Aspergillus*, *Bacillus* nebo *Pseudomonas*, je schopno syntetizovat lipopeptidy. Jedná se o pozoruhodnou třídu „samo-montážních“ molekul, které jsou schopny tvořit peptidové nanostruktury. Tyto molekuly jsou charakterizovány malým, lineárním nebo kruhovým oligopeptidem, spojeným s β -hydroxy mastnou kyselinou. Mnoho lipopeptidů kromě snižování povrchového napětí vykazuje také antibakteriální účinky [27, 33].

2.5.3 Biotechnologická aplikace biosurfaktantů

Biosurfaktanty mají širokou škálu biotechnologických aplikací v potravinách, ropě, nápojích, kosmetice, detergentech, textiliích, barvách, těžbě, průmyslu zpracovávajícím celulózu, farmacii a nanotechnologiích. V současné době je hlavním trhem ropný průmysl. Biosurfaktanty mohou být použity pro regeneraci zbytků ropy ze skladovacích nádrží, jiných procesů regenerace ropy, čištění ropných skvrn a bioremediaci jak půdy, tak vod [32].

2.5.3.1 Regenerace ropy

Ropa je základním zdrojem energie a hnací silou hospodářského rozvoje. Prostřednictvím procesů regenerace ropy ropné vrty produkují pouze třetinu až polovinu původně přítomné suroviny v lokalitě. Malé kapky oleje jsou zachyceny mezi uhlovodíkem a vodou. Pro

mobilizaci uhlovodíku je potřeba snížení mezifázového napětí. Na toto snížení je možné použít biosurfaktanty [32].

2.5.3.2 Aplikace v medicíně

Biosurfaktanty se využívají v terapeutických aplikacích díky svým fungicidním, baktericidním, insekticidním a antivirovým vlastnostem. Užívají se také jako antiadhezní činidla a inhibitory enzymů. Přestože biosurfaktanty vykazují antimikrobiální aktivitu, je jejich využití ve farmaceutickém průmyslu a biomedicíně omezené. Avšak některé lipopeptidy jako daptomycin, cyklický rozvětvený lipopetid, našly v tomto odvětví využití. Tento lék se užívá pro léčbu kožních infekcí způsobených gram-pozitivními patogeny [32].

2.5.3.3 Využití biosurfaktantů v potravinářství

Pro tvorbu konzistence a textury v potravinách a pro spoustu dalších aplikací je důležitá emulgace. Obecnou funkcí emulgátoru je stabilizování emulze. Emulze je složena z alespoň jedné nemísitelné kapaliny, která je dispergována k druhé kapalině ve formě kapiček. Stabilita tohoto systému je minimální, avšak může být zvýšena přidáním povrchově aktivního činidla, které sníží povrchovou energii mezi oběma fázemi snížením mezifázového napětí. Příkladem potravin ve formě emulzí jsou krémy, máslo, majonéza, zálivky a náplně [32].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V bakalářské práci byl zkoumán biotechnologický potenciál bakterie *Pseudomonas thermotolerans*. Bakterie byla zakoupena v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo a nese označení DSM 14292.

3.1.2 Použité chemikálie

- 1,4-butandiol, (Sigma-Aldrich)
- Agar powder w/1 % peptone, (HiMedia)
- Agaróza, (Serva)
- Antracen, (Sigma Aldrich)
- Beef Extract Powder, (HiMedia)
- Citrát železito-amonný, (Fluka)
- D-glukosa monohydrate g.r., (Lach-Ner)
- Dekanoát, (Lach-Ner)
- Dihydrát chloridu vápenatého, (Lachema)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma-Aldrich)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, (Sigma Aldrich)
- Ethanol, (VWR Chemicals BDH PROLABO)
- Ethylendiamintetraacetát sodný, (Lach-Ner)
- Fruktóza, (Lach-Ner)
- Glycerol, (Lachema)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, (Sigma-Aldrich)
- Chlorid amonný, (Lach-Ner)
- Chloroform, (Lach-Ner)
- Kyselina levulová, (GFBiochemical)
- Kyselina octová, (Lach-Ner)
- Kyselina oktanová, (Sigma-Aldrich)
- Kyselina valerová, (Sigma-Aldrich)
- Kyselina sírová, (Lach-Ner)
- Master mix One *Taq* Hot Start, (New England BioLabs)
- Methanol, (VWR Chemicals BDH PROLABO)
- $MgCl_2$, (Thermo Scientific)
- Midori Green Advance, (Nippon Genetics Europe)
- n-hexan, (VWR Chemicals BDH PROLABO)
- Nutrien Broth, (HiMedia)
- Orcinol, (Sigma-Aldrich)
- PCR loading buff, Yellow load, (Top-Bio)
- Peptone, (HiMedia)
- Síran amonný, (Lach-Ner)
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, (Lach-Ner)

- Triton X-100, (Sigma-Aldrich)
- Yeast extract powder, (HiMedia)

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy ew 620-3NM, (KERN)
- Centrifuga Hettich EBA 20, (MANEKO)
- Centrifuga Sartorius Weender Landestrasse, (Sigma Santorius)
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, (HERMLE)
- ELISA reader ELx808, (BioTek)
- Laminární box Aura mini, (BioAir-Euroclone)
- Magnetická míchačka bez ohřevu Kartell, (MERCİ s.r.o.)
- Nanofotometr P 300, (Implen)
- Plynový chromatograf s FID, (Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm)
- Temperovaná třepačka Incubator 1 000, (Heidolph)
- Temperovaná třepačka (inkubátor) Orbitah shaker ES-20, (Biosan)
- Termoblok Block heater SBH130D, (Stuart)
- Tenziometr Sigma 701, (KSV)
- Vodní lázeň BL 4/150, (WSL)
- Vortex BENCHMIXER, (Benchmark Scientific, Inc.)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Příprava inokulačního média

Kultura byla uchovávána při -80°C v kryozkumavce obsahující 10% roztok glycerolu. Bakterie byly rozočkovány z kryozkumavek na Petriho misky kultivované při teplotě 45°C , obsahujících pevné médium Nutrient Broth o složení:

- | | |
|--------------------|----------|
| • Pepton | 10,00 g |
| • Beef extrakt | 10,00 g |
| • NaCl | 5,00 g |
| • Agar | 17,00 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

Po kultivaci byly bakterie uchovávány při 4°C a každých 30 dní přeočkovány na nové Petriho misky.

Inokulační média o objemu 50 ml byla připravena do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Veškerá média byla vždy připravena rozpuštěním naváženého množství látek v destilované vodě ve dvou paralelních sadách. Média byla poté vysterilizována a následně ochlazená na laboratorní teplotu. Ve sterilním laminárním boxu byla třikrát zaočkována z pevného média bakteriologickou kličkou. Připravená inokula byla kultivována po dobu 24 h na temperované třepačce při 45°C a 180 rpm.

Jako inokulační médium byl použit Nutrien Broth o složení:

- Pepton 10,00 g
- Beef extrakt 10,00 g
- NaCl 5,00 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

3.2.2 Příprava produkčních médií

V postupu byla vyzkoušena dvě produkční média o různých složeních. Produkční média o objemu 100 ml byla připravena do 250 ml Erlenmeyerových baněk. Média byla připravena rozpuštěním naváženého množství látek v destilované vodě. Média byla poté vysterilizována a ochlazená na laboratorní teplotu. Byly připraveny roztoky stopových prvků TES a MES, vysterilizovány a ochlazeny na laboratorní teplotu.

Ve sterilním laminárním boxu byly do média přidány roztoky glukózy a fruktózy v koncentraci 20 g/l a stopových prvků podle nároků bakterie. Ve sterilním laminárním boxu bylo do médií rovněž zaočkováno 10 ml inokulačního média. Připravená média byla kultivována 72 h na temperované třepačce při teplotě 45 °C a 180 rpm.

Složení 1. produkčního média:

- Na₂HPO₄ · 12 H₂O 9,00 g
- KH₂PO₄ 1,50 g
- MgSO₄ · 7 H₂O 0,20 g
- NH₄Cl 1,00 g
- CaCl₂ · 2 H₂O 0,02 g
- Fe (III) NH₄ – citrát 0,0012 g
- Glukóza 20,00 g
- TES 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Složení roztoku stopových prvků TESII termo:

- EDTA 50,00 g
- FeCl₃ · 6 H₂O 13,80 g
- ZnCl₂ 0,84 g
- CuCl₂ · 2 H₂O 0,13 g
- CoCl₂ · 6 H₂O 0,10 g
- MnCl₂ · 6 H₂O 0,016 g
- H₃BO₃ 0,10 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Složení 2. produkčního média:

- Na₂HPO₄ · 12 H₂O 11,10 g
- (NH₄)₂SO₄ 1,00 g

- KH_2PO_4 1,05 g
- Fruktóza 20,00 g
- MES 1 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

Složení roztoku stopových prvků MES:

- FeCl_3 9,70 g
- CaCl_2 7,80g
- CuSO_4 0,156 g
- CoCl_2 0,119 g
- NiCl_2 0,118 g
- CrCl_2 0,062 g
- 0,1 M HCl 1 000 ml

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu

Pro přípravu 10x koncentrovaného TBE pufru bylo použito:

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan 108,00 g
- H_3BO_3 55,00 g
- EDTA 9,30 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

3.3.2 Příprava lyzačního pufru

Navážka 0,0605 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 80 ml destilované vody. Následně proběhla úprava pH na hodnotu 8,5 pomocí HCl a objem byl doplněn na 100 ml. Takto vzniklý roztok byl vysterilizován a zamražen na následné použití.

3.3.3 Příprava agarózového gelu pro elektroforézu

Byly naváženy 2 g agarózy a rozmíchány v 100 ml 1krát koncentrovaného TBE pufru. Následně byla směs zahřívána až do úplného rozpuštění agarózy v mikrovlnné troubě. Roztok byl částečně ochlazen a bylo do něj napipetováno 5 μl barviva Midori Green. Opatrně, tak aby se nevytvořili žádné vzduchové bubliny, byl gel přelit do formy a byly do něj vnořeny hřebínky pro tvorbu jamek. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty.

3.3.4 Příprava vyvíjecí směsi pro tenkovrstvou chromatografii

Pro přípravu vyvíjecí směsi byly použity chemikálie v tomto poměru:

- Chloroform:Methanol:20% kyselina octová 65:15:2

3.3.5 Detekční činidlo

Pro vizualizaci rhamnolipidů, bylo připraveno detekční činidlo o složení:

- Orcinol 0,15 g
- 60 % kyselina sírová 8,20 g
- Destilovaná voda 42,00 ml

3.4 Použité metody

3.4.1 Izolace bakteriální DNA

Izolace DNA byla uskutečněna pomocí tepelné lyze, kdy bylo do Eppendorfovy zkumavky napipetováno 100 μ l lyzačního pufru. Do pufru byly přidány buňky pomocí bakteriologické kličky a následně byl vzorek inkubován při 99,9 °C po dobu 15 minut v blokovém termostatu. Po vyjmutí byl vzorek 10 minut centrifugován při 10 000 rpm. Poté bylo odpipetováno 70 μ l supernatantu s obsahem DNA do nové Eppendorfovy zkumavky.

3.4.2 Stanovení čistoty DNA pomocí spektrofotometru

Čistota DNA byla stanovena pomocí Nanofotometru. Vzorek DNA byl proměřen v objemu 3 μ l a jako blank bylo použito 3 μ l čistého pufru. Následně byla odečtena hodnota koncentrace DNA v μ g/ml a poměr A260/A280. Ideální poměr je 1,800, nižší hodnota indikuje znečištění proteiny, vyšší kontaminaci RNA.

3.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce slouží ke zmnožení DNA replikací nukleových kyselin. Pomocí PCR byla prováděna amplifikace fragmentů DNA o délce 1965 bp, pomocí primerů E1-D a E1R. Jedná se o gen *phaC1*, který se vyskytuje u bakterií schopných syntézy mcl-PHA. Sekvence bází primerů jsou zobrazeny v Tab. 1.

Tab. 1: Sekvence využitých primerů

Primer	Sekvence bází
E1-D	GGA GCG TCG TAG ATG AGT AAC AAG AA
E1R	AGG TTG GCG CCG ATG CCG TTG AA

3.4.3.1 Příprava vzorků pro PCR

Směs pro PCR amplifikující gen *phaC1* byla připravena podle Tab. 2:

Tab. 2: Složení směsi pro PCR

Komponenta	Objem vzorek 1	Objem vzorek 2
MasterMix	12,50 μ l	12,50 μ l
DNA	2,00 μ l	1,00 μ l
Mg ²⁺ ionty	1,80 μ l	1,80 μ l
Primery (E1D + E1R)	1 μ l + 1 μ l	1 μ l + 1 μ l
Sterilní voda	6,70 μ l	7,70 μ l
Celkový objem	25,00 μ l	25,00 μ l

Pro PCR byl použit teplotní program podle Tab. 3:

Tab. 3: Teplotní program PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	98	30	1
2	98	30	30
	62	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	

3.4.3.2 Stanovení PCR amplikonů pomocí gelové elektroforézy

Byla vytvořena směs z 3 μ l nanášecího pufru a 10 μ l vzorku. 10 μ l této směsi bylo naneseno do jamek ve 2% agarózovém gelu. Do jedné z jamek bylo také naneseno 5 μ l DNA žebříčku s definovanou velikostí fragmentů. Vana s gelem byla převrstvena připraveným TBE pufrem vyředěným na 1% koncentraci a to tak, aby byl celý gel ponořený elektrolytem. Poté byla vana připojena ke zdroji napětí a následně byla spuštěna elektroforéza na 60 minut při 90 V. Poté byl gel vyjmut z vany a pozorován pod UV transluminátorem.

3.4.4 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanoven jak spektrofotometricky, tak gravimetricky. Při spektrofotometrické metodě založené na měření zákalu, bylo měřeno při vlnové délce 630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. Suspenze poté byla podle potřeby naředěna destilovanou vodou tak, aby hodnota absorbance nepřesahovala číslo 1. Výsledná suspenze o objemu 3 ml byla napipetována do kyvety a proměřena ve třech paralelních měřeních.

Pro gravimetrické stanovení bylo odebráno 10 ml vzorku do centrifugační zkumavky a byl stočen při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit, k biomase bylo přidáno 0,5 ml a směs byla zvortexována. Suspenze byla přelita do Eppendorfových zkumavek a stočena při 10 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a biomasa sušena do konstantní hmotnosti při 70 °C. Následně byla biomasa zvážena a vypočtena její koncentrace v g/l. Stanovení bylo provedeno ve dvou paralelních provedeních.

3.4.5 Stanovení obsahu PHA

3.4.5.1 Stanovení obsahu PHA v biomase

Do vialek bylo naváženo přibližně 10 mg suché biomasy. K biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi (15 % kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/l kyseliny benzoové). V rámci probíhající reakce dochází k naštěpení vzniklých polymerů 3-hydroxykyselin v biomase na nízkovroucí methylestery daných kyselin. Vialky byly zavíčkované, protřepány a po dobu 3 hodin udržovány v termobloku při teplotě 94 °C pro esterifikaci. Po esterifikaci byla směs ochlazena a extrahována v 0,5 ml 0,05M NaOH. Směs byla protřepána a po chvíli stání se vytvořilo rozhraní dvou fází. Do nových vialek bylo odpipetováno 50 μ l ze spodní chloroformové fáze do 950 μ l chloroformu. Vialky byly následně uzavřeny a proběhla analýza pomocí plynové chromatografie s FID (plamenový ionizační) detektorem. Analýza byla provedena ve dvou paralelních provedeních.

3.4.5.2 Stanovení kalibrační křivky pro plynovou chromatografii

Do připravených vialek byl přidán roztok komerčně dostupného PHA o přesné koncentraci 10 mg/ml v množství 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml. Objem byl doplněn chloroformem do 1 ml a následně bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi a bylo postupováno stejně jako u vzorků v kapitole 3.4.5.1 .

3.4.6 Stanovení utilizace vybraných substrátů

Nejvhodnější 1,5x koncentrované minerální médium obsahující stopové prvky bylo napipetováno do jamek mikrotitrační destičky v objemu 100 μ l. Do těchto médií bylo přidáno 50 μ l příslušného substrátu dané koncentrace (viz Tab. 4). Nakonec byla média zaočkována 20 μ l inokula. Na Elisa readeru byly při vlnové délce 630 nm proměřeny výchozí hodnoty absorbancí. Kromě vzorků byl také připraven blank s destilovanou vodou. Destičky poté byly kultivovány při teplotě 45 °C a 180 rpm po 72 hodin. Po kultivaci byla opět proměřena absorbance při 630 nm. Veškeré substráty byly připraveny v triplikátech.

Tab. 4: Seznam substrátů a jejich koncentrace

20 g/l	4 g/l	8 g/l
fruktóza	acetát sodný	ϵ -kaprolakton
glukóza	propionát sodný	1,4-butandiol
sacharóza	*kyselina valerová	1,6-hexandiol
D-xylóza	*kyselina levulová	γ -butyrolakton
laktóza		
galaktóza		
glycerol		
slunečnicový olej		

*pH bylo pomocí 30 % NaOH upraveno na hodnotu 7

3.4.7 Stanovení biosurfaktantů

Ve všech níže uvedených metodách byl jako pozitivní kontrola použit 5% roztok Tritonu X-100 a jako negativní kontrola destilovaná voda.

5% roztok Tritonu X-100 byl připraven smícháním 5 ml Tritonu X-100 s 95 ml destilované vody.

Jako vzorky byly použity supernatanty získané po kultivaci bakterií na různých médiích a jejich následnou centrifugací.

3.4.7.1 Stanovení aktivity emulze – „Emulsification capacity assay“

Do skleněných zkumavek byly napipetovány 3 ml vzorku, nebo pozitivní či negativní kontroly. Ke vzorku byly přidány 3 ml n-hexanu. Zkumavky byly zazátkovány a 1 minutu míchány na vortexu. Takto připravené vzorky byly ponechány 24 hodin při laboratorní teplotě v digestoři. V případě přítomnosti biosurfaktantů došlo k vytvoření emulgační vrstvy. Poté byla pomocí pravítka změřena výška vzniklé emulzní vrstvy a byly zaznamenány vizuálně pozorovatelné změny.

3.4.7.2 Solubilizace krystalického antracenu – „Solubilization of crystalline anthracene“

Do centrifugačních zkumavek bylo nasypáno malé množství hydrofobních krystalů antracenu. Na tyto krystaly bylo přidáno 5 ml vzorku, pozitivní či negativní kontroly. Směs byla inkubována na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Vzorky poté byly zcentrifugovány při 6 000 rpm po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly proměřeny fotometricky při vlnové délce 354 nm v křemenné kyvetě, kdy jako blank byla použita negativní kontrola. Koncentrace rozpuštěného antracenu souvisí s množstvím biosurfaktantů ve vzorku.

3.4.7.3 Stanovení biosurfaktantů metodou Du-Nouy-Ring

Princip této metody spočívá v měření síly potřebné k oddělení platinového kroužku, který interaguje se vzorkem, z jeho rozhraní. Tato síla je úměrná povrchovému napětí.

Metoda byla provedena pomocí automatizovaného tenziometru Sigma 701. Nastavení dílčích parametrů bylo pomocí softwaru SGSERVER. Vzorek o objemu 30 ml byl přelit do nízké kádinky a vložen do přístroje. Bylo spuštěno měření, které trvalo 10 minut, a bylo během něj získáno 10 hodnot. Naměřená data poté byla převedena do MS Excelu a vzorek byl vyjmut. Před následujícím měřením byla kádinka důkladně vymyta a platinový kroužek opálen nad kahanem. Přítomnost produkce biosurfaktantů je průkazná, pokud dojde ke snížení povrchového napětí kapalného média na hodnotu 40 mN/m nebo nižší.

3.4.7.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Vzorek pro chromatografii byl připraven pomocí extrakce v ethylacetátu. Do dělicí nálevky byl nalit vzorek a ethylacetát v poměru 1:1. Následně proběhlo vytřepávání, a poté byla odebrána organická fáze a do sucha odpařena na vakuové odparce.

Po extrakci byly vzorky a komerční rhamnolipidový extrakt rozpuštěny v 99,8 % ethanolu. Na hliníkovou destičku pokrytou silikagelem bylo na startovní čáru nanášeno 5 µl daného vzorku. Komerční rhamnolipidový extrakt byl použit jako standard. Destička poté byla vložena do komory s vyvíjecí směsí, která se nechala asi 60 minut vzlínat. Následně byla destička vyjmuta a tužkou bylo poznačeno místo vyvzlínání vyvíjecí směsi. Po vysušení bylo na destičku nanášeno detekční činidlo a po 10 minut probíhala inkubace při 80 °C.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Schopnost bakterie produkovat PHA

Pro zjištění přítomnosti genu PHA syntázy byla použita metoda PCR. Vzhledem k vlastnostem bakterie byla metoda nastavena na detekci amplifikovaného genu *phaC1*, která schopnost bakterie *Pseudomonas thermotolerans* produkovat mcl-PHA potvrdila.

DNA pro PCR byla připravena pomocí tepelné lyze. Následně byla proměřena čistota DNA na nanofotometru. Hodnota čistoty byla odečtena podle poměru absorbance 260 nm/280 nm. Jako pozitivní kontrola byla použita *Pseudomonas putida*.

Tab. 5: Hodnoty koncentrace a čistoty DNA pozitivní kontroly *Pseudomonas putida* a zjišťovaného vzorku *Pseudomonas thermotolerans*

	A_{260}/A_{280} [-]
PK	1,987
Vzorek	1,771

V Tab. 5 lze vidět srovnání čistoty DNA pozitivní kontroly a vzorku. Z výsledků můžeme soudit, že pozitivní kontrola ani vzorek nejsou znečištěny proteiny či RNA. Pro amplifikaci genu *phaC1* byla použita metoda PCR na jejíž provedení byl vzorek připraven podle kapitoly 3.4.3.1. Detekce přítomnosti genu proběhlo pomocí gelové elektroforézy.



Obr. 7: Gelová elektroforéza: NK - negativní kontrola, PK - pozitivní kontrola *Pseudomonas putida*, V1 - *Pseudomonas thermotolerans* koncentrovaný vzorek, V2 - *Pseudomonas thermotolerans* 1x zředěný vzorek

Metoda PCR potvrdila přítomnost genu PHA syntázy mcl-PHA. Na Obr. 7 můžeme vidět patrné bendy o velikosti zhruba 1900 bp, což je velikost odpovídající genu *phaC1*. Bendy vzorků jsou méně výrazné, než bendy u pozitivní kontroly, což může být způsobeno nižší koncentrací DNA

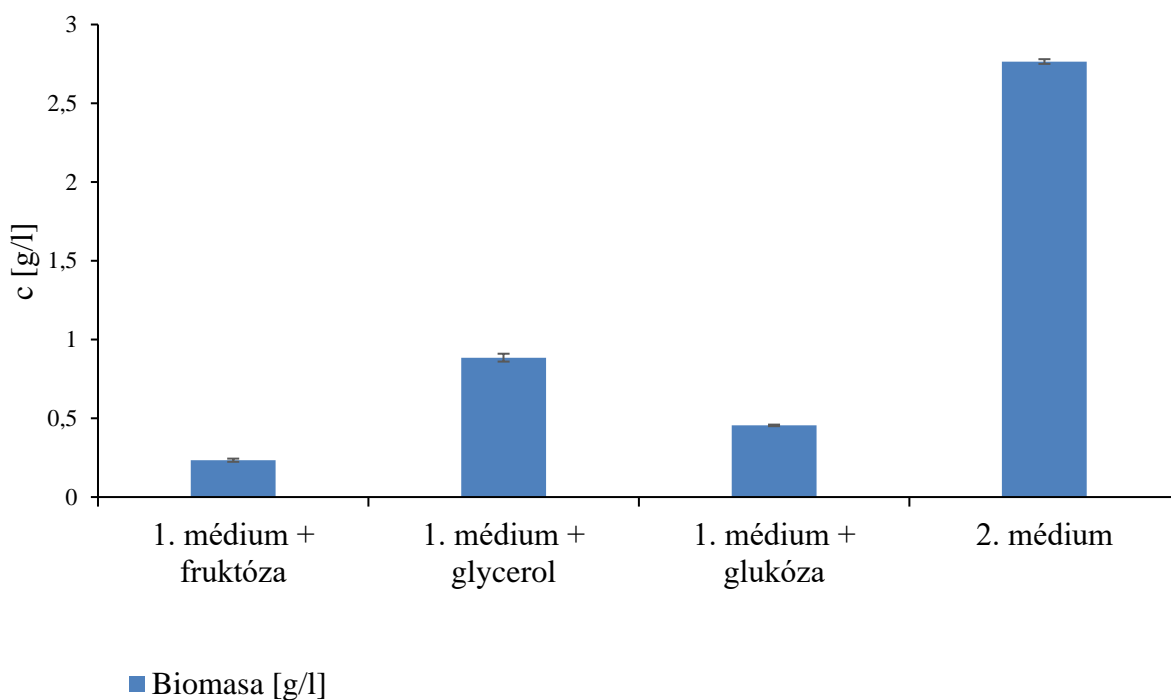
ve vzorku. Z tohoto testu tedy můžeme usuzovat, že bakterie *Pseudomonas thermotolerans* má potenciál pro produkci polyhydroxyalkanoátů.

4.2 Optimalizace podmínek produkce

Vzhledem k pozitivním výsledkům při testu přítomnosti *phaC1* genu, byly dále optimalizovány podmínky růstu a produkce PHA. Proběhla optimalizace složení minerálního média, teploty, zdroje uhlíku a vliv prekurzorů na růst bakterie a produkci PHA.

4.2.1 Výběr minerálního média

Pro další postupy byly bakterie kultivovány v inokulačním médiu. Postup kultivace je popsán v kapitole 3.2.1. Byly porovnávány dvě minerální média pro růst bakterie *Pseudomonas thermotolerans*. Složení obou médií je popsáno v 3.2.2. Médium číslo 1 bylo testováno s různými cukry jako zdroji uhlíku, a to fruktózou, glycerolem a glukózou. V médiu číslo 2 byla jako zdroj uhlíku použita fruktóza.

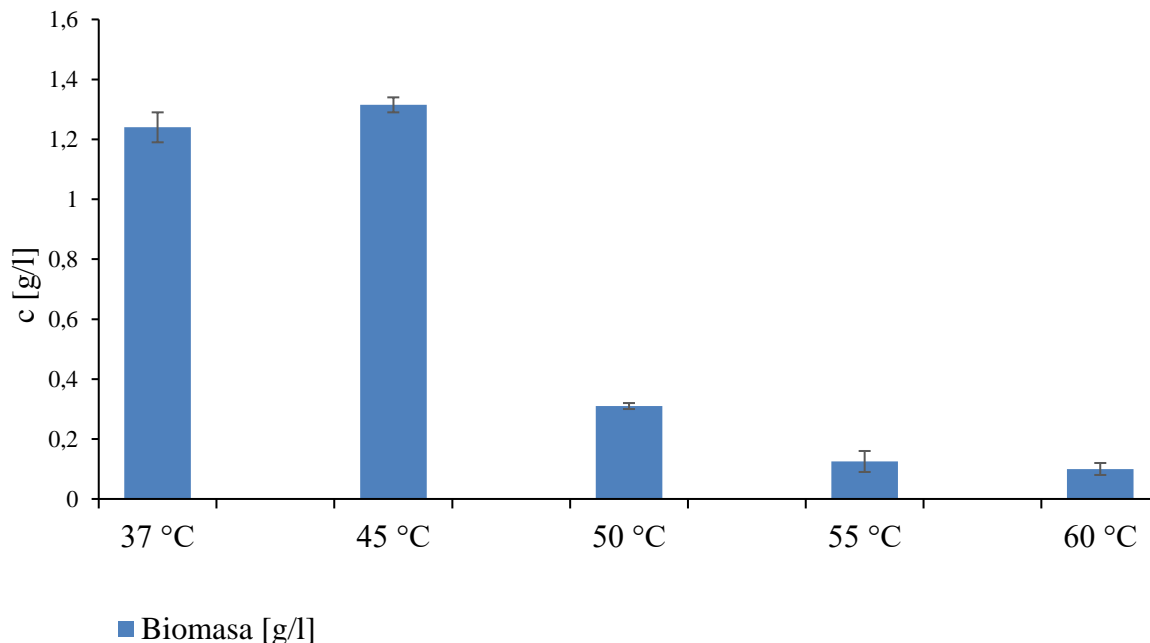


Obr. 8: Stanovení množství biomasy ve dvou různých produkčních médiích s různými zdroji uhlíku

Na Obr. 8 můžeme vidět, že v 2. médiu bylo až 6x více biomasy než v médiu číslo 1 a to 2,765 g/l. Bakterie v žádném z médií neprodukovaly PHA. To může být způsobeno vlastností bakterie rodu *Pseudomonas* produkovat pouze mcl-PHA. Řetězec použitých uhlíkových zdrojů může být na produkci mcl-PHA nedostačující. Pro další práci bylo jako produkční médium užíváno médium číslo 2.

4.2.2 Výběr optimální teploty růstu

Další z metod optimalizace růstu a produkce bakterií byla optimalizace teploty. Dříve vybrané minerální médium bylo testováno při teplotě 37, 45, 50, 55 a 60 °C. Podle sbírky, ze které byla bakterie pořízena by měla být její optimální teplota růstu 45 °C.

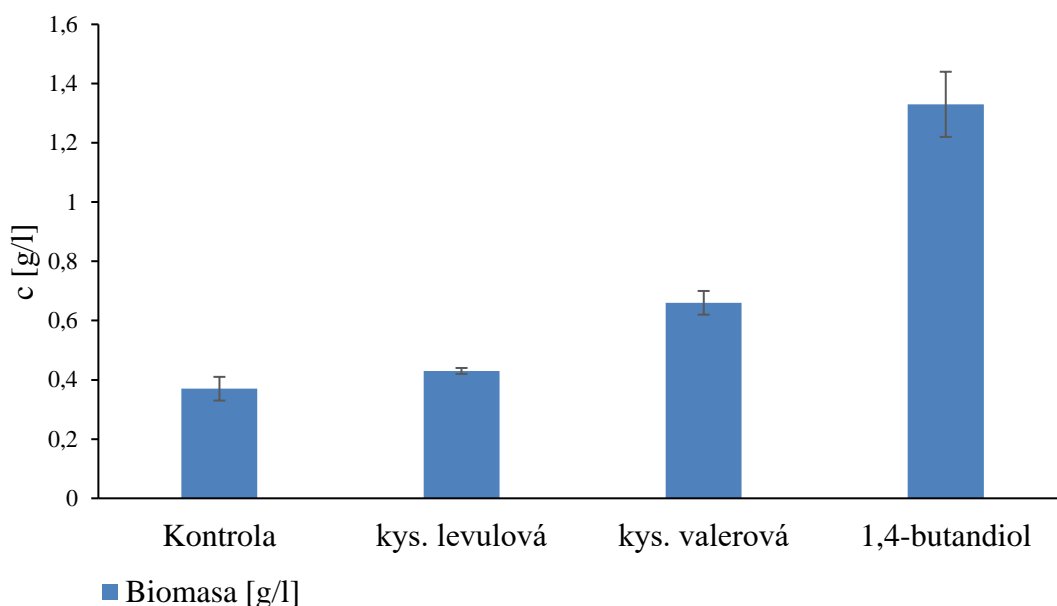


Obr. 9: Stanovená koncentrace biomasy pro růst při různých hodnotách teploty

Na Obr. 9 je patrné, že optimální růstová teplota bakterie je opravdu 45 °C, kdy byla stanovena koncentrace biomasy 1,315 g/l, čímž byla potvrzena informace ze sbírky. Z obrázku je patrné, že bakterie lépe snáší teploty nižší jejímu optimu než teploty vyšší. Velký nárůst byl zaznamenán i při 37 °C, a to 1,24 g/l biomasy. S přibývajícím teplotou došlo k inhibici růstu. Ani při změně teploty nedošlo k tvorbě PHA, a to patrně z výše zmíněného důvodu, kdy je délka řetězce uhlíkového zdroje pro tvorbu mcl-PHA nedostačující.

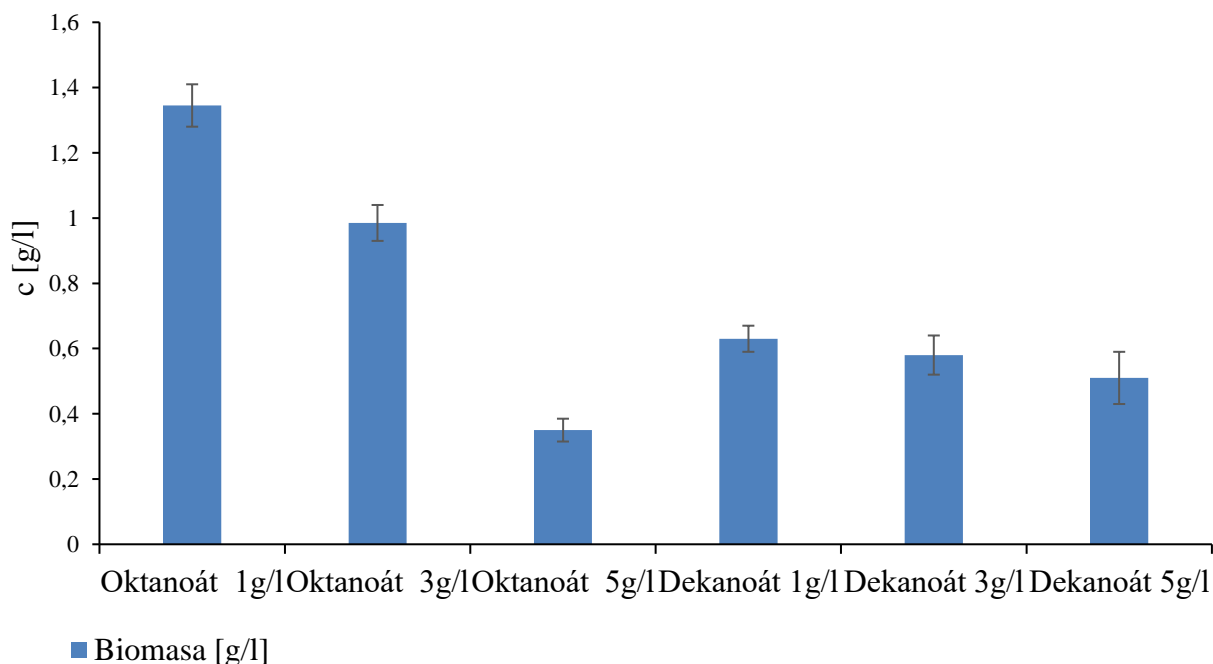
4.2.3 Přidávání prekurzorů pro produkci PHA

Produkcí polymeru s delšími řetězci monomerních jednotek je možné podpořit přidáním prekurzorů. Pro produkci poly(3-hydroxyvalerátu) bylo použito 0,176 ml kyseliny levulové, 0,213 ml kyseliny valerové a 0,180 ml 1,4-butandiolu na 100 ml minerálního média, tedy koncentrace 2 g/l příslušného prekurzoru. Pro srovnání sloužilo minerální médium s fruktózou bez obsahu dalších látek.



Obr. 10: Stanovené množství biomasy po přidání různých prekurzorů pro produkci

Na Obr. 10 můžeme vidět, že největší množství biomasy bylo při použití prekurzoru 1,4-butandiolu, a to 1,33 g/l. Ve všech případech došlo k nárůstu množství biomasy po přidání prekurzorů oproti minerálnímu médiu bez prekurzoru. Bakterie ani po přidání prekurzorů neprodukovala polyhydroxyalkanoáty. Důvodem, proč ani v tomto případě nebyl polymer produkován může být stále nedostačující délka řetězce uhlíkového zdroje. Z tohoto důvodu byly k dalšímu pokusu jako prekurzory použity oktanoát a dekanoát, které mají řetězce o délce 8 a 10 uhlíků. Obě sloučeniny byly přidány v koncentracích 1, 3 a 5 g/l.

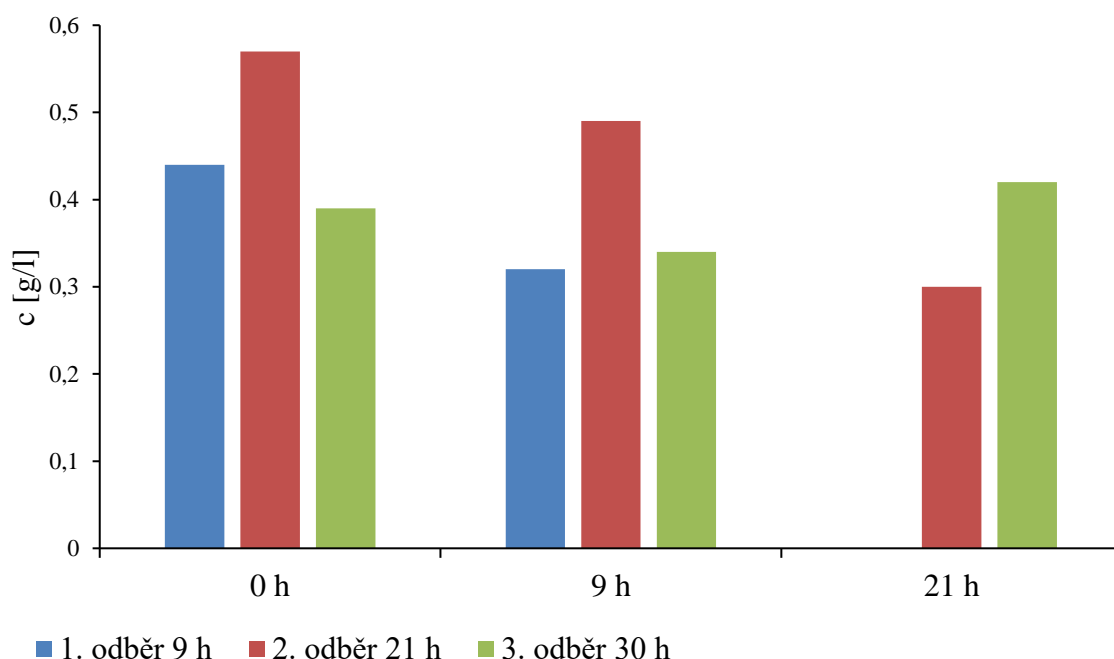


Obr. 11: Stanovené množství biomasy po přidání prekurzorů pro tvorbu poly(3-hydroxyoktanoátu) a poly(3-hydroxydekanoátu)

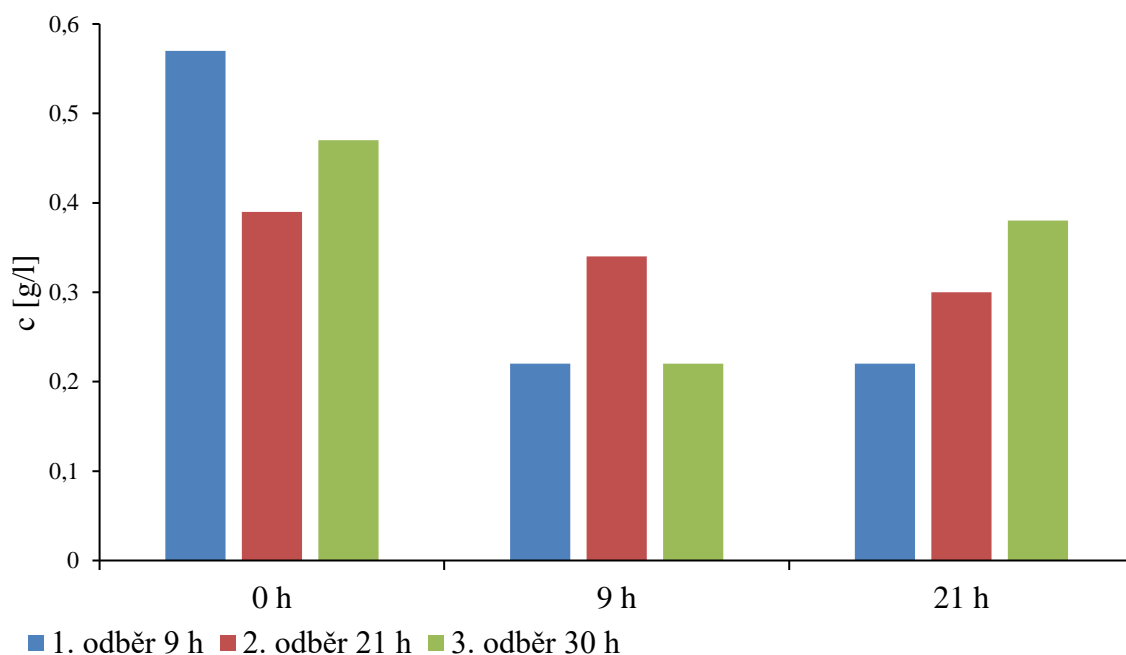
Z Obr. 11 je patrné, že největší růst biomasy nastal po přidání oktanoátu v koncentraci 1 g/l. Výsledná koncentrace biomasy v tomto případě byla 1,345 g/l. Největší nárůst biomasy v případě dekanoátu byl také u koncentrace 1 g/l a výsledné množství biomasy činilo 0,63 g/l. Z výsledků vyplývá, že s narůstající koncentrací prekurzoru docházelo k inhibici růstu buněk, což se projevilo nižší koncentrací biomasy. Ani v tomto případě bakterie neprodukovaly polyhydroxyalkanoáty. Jednou z možností, proč bakterie nebyly schopny produkovat PHA je, že kultura nebyla dostatečně narostlá, a tudíž nebyla schopná produkce polymeru.

4.2.4 Přidávání prekurzoru v různém čase

Jelikož jednou z možností, proč bakterie nebyly schopny produkovat PHA mohlo být, že kultura nestihla narůst do množství, aby mohla polymery produkovat, byl v tomto testu přidáván prekurzor v různých časech. Tento pokus byl proveden podle článku týmu Satoh Y. a spol., kterým se podařila produkce PHA v biomase až o obsahu 28 % [35]. Pro pokus bylo použito minerální médium se dvěma různými zdroji uhlíku, a to nesacharidovým glycerolem a sacharidem fruktózou. Jako prekurzor byl použit oktanoát v koncentraci 1 g/l. Přidávání prekurzoru probíhalo v časech 0, 9 a 21 hodin a odebrání vzorku poté v časech 9, 21 a 30 hodin od začátku kultivace. Všechny odběry vzhledem k množství média byly prováděny pouze jednou.



Obr. 12: Stanovené množství biomasy v minerálním médiu s fruktózou po přidání oktanoátu jako prekurzoru



Obr. 13: Stanovení množství biomasy v minerálním médiu s glycerolem po přidání oktanoátu jako prekursoru

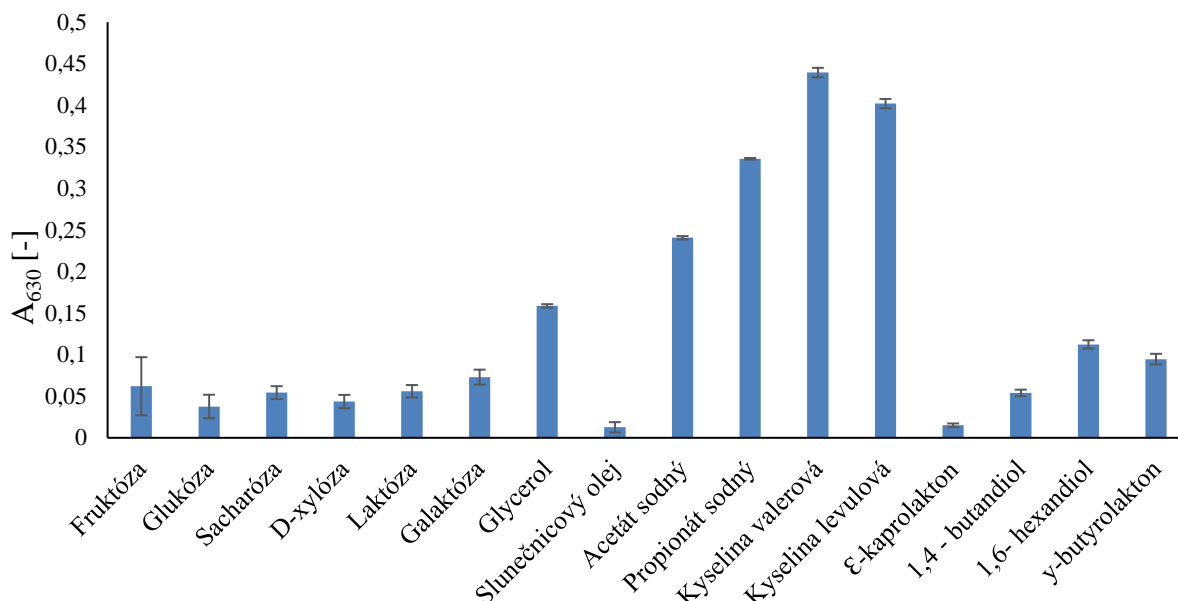
Na Obr. 12 je zobrazena koncentrace biomasy s použitím fruktózy jakožto zástupce sacharidového substrátu. Největší koncentrace biomasy byla po přidání oktanoátu v čase 0 h s kultivací po dobu 21 hodin. Koncentrace biomasy v tomto případě byla 0,57 g/l.

Na Obr. 13 je zobrazena koncentrace biomasy s použitím glycerolu jako zdroje uhlíku. Největší koncentrace biomasy byla po přidání oktanoátu v čase 0 h s kultivací po dobu 9 h. Koncentrace biomasy zde dosahuje hodnoty 0,58 g/l. To je zároveň největší množství biomasy z celého experimentu. Nejnižší množství biomasy celého experimentu je na glycerolu s přidáním oktanoátu po 9 h a odběrem po 30 h celkové kultivace média. Koncentrace biomasy zde dosahuje hodnoty 0,22 g/l. Tento pokles je způsoben pravděpodobně vyčerpáním zdrojů živin.

Ani v tomto případě se nepodařilo zopakovat výsledek týmu Satoh Y. a spol. [35]. Nebyla zaznamenána žádná produkce polyhydroxyalkanoátů. Bakterie tedy obsahují gen *phaC1*, avšak jejich schopnost produkce PHA nebyla v žádném z experimentů prokázána.

4.2.5 Stanovení utilizace vybraných substrátů

Cílem následujícího experimentu bylo posoudit schopnost utilizace vybraných substrátů při 72 hodinové submerzní kultivaci. Byl sledován nárůst bakteriální kultury po přidání různých druhů substrátů a proměřena absorbance při vlnové délce 630 nm v čase 0 a 72 hodin. Následně byl zpracován rozdíl těchto dvou měření. Mikrotitrační destička byla připravena podle kapitoly 3.4.6.



Obr. 14: Výsledky pozorování změn intenzity zákalu po přidání různých substrátů

Na Obr. 14 můžeme vidět nárůst kultury na různých substrátech. Největší nárůst byl celkově na skupině více uhlíkatých kyselin a jejich solí. O něco nižší nárůst byl sledován na nesacharidovém zdroji, glycerolu. Celkově nejnižší byl pozorován na skupinách kyslíkatých uhlovodíků a monosacharidů konkrétně na glukóze. Největší nárůst byl na substrátu kyseliny valerové. Můžeme tedy říci, že pro *Pseudomonas thermotolerans* jsou vhodnější zdroje, které biochemicky snadno vstupují do biochemických drah lipidů.

4.3 Produkce biosurfaktantů

4.3.1 Stanovení emulgační aktivity

Jedná se o poměrně snadnou metodu, díky které je možné poznat potenciálního producenta biosurfaktantů. Tato metoda je založena na vytvoření emulze a mělo by platit, že čím je emulze sytější, tím je biosurfaktant koncentrovanější. Test byl proveden podle kapitoly 3.4.7.1. Emulgační aktivita byla vypočtena podle rovnice (1):

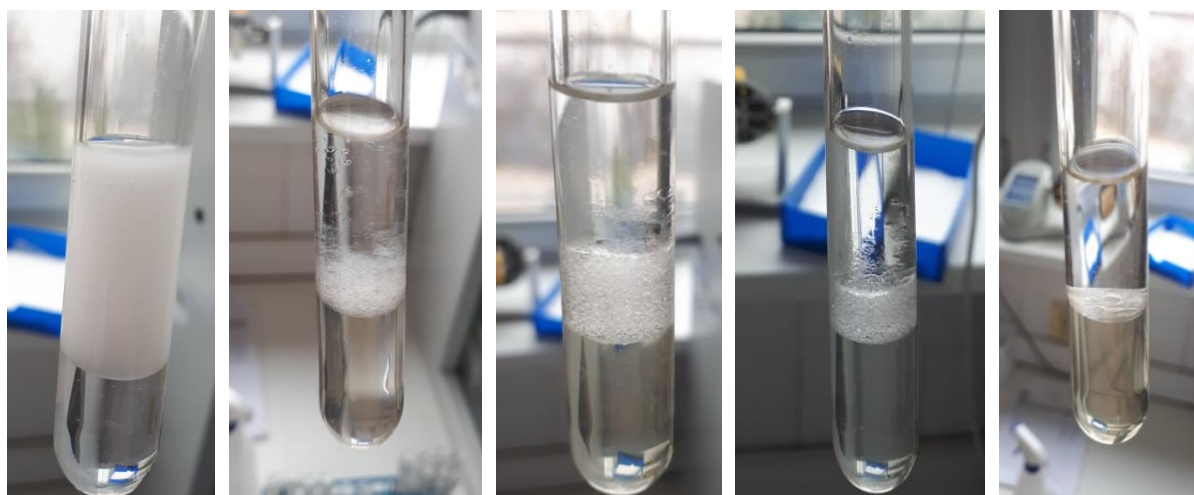
$$E_{24} = \frac{h_{emulze}}{h_{tot}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Pro test bylo použité minerální médium s různými zdroji uhlíku. Byl použit kvasnicový extrakt s fruktózou, kvasnicový extrakt s glukózou a samotná fruktóza se samotnou glukózou. Vždy bylo porovnáno čisté médium bez kultury a médium s kulturou.

Tab. 6: Emulgační index a vzhled emulze

Označení	Substrát	E ₂₄ [%]	Vzhled emulze
Kontrola	extrakt + fruktóza	0,0	2 fáze, bez emulze, průhledné
Vzorek	extrakt + fruktóza	0,0	bez emulze, rozhraní 2 fází, průhledné
Kontrola	extrakt + glukóza	0,0	bez emulze, rozhraní 2 fází, průhledné
Vzorek	extrakt + glukóza	21,4	bílá nekompaktní vrstva, tvoří řetízky, děrovaná
Kontrola	fruktóza	0,0	2 fáze bez emulze, průhledné
Vzorek	fruktóza	19,6	bezbarvá kompaktní, děrovaná
Kontrola	glukóza	0,0	2 fáze, bez emulze
Vzorek	glukóza	7,4	kompaktní bezbarvá emulze, tvoří řetízky
	PK	60	bílá, velmi kompaktní emulze, souvislá, bez pórů
	NK	-	2 fáze, bez emulze

V Tab. 6 je možné pozorovat srovnání emulgačního indexu pozitivní kontroly a vzorku *Pseudomonas thermotolerans* na různých substrátech. Pozitivní kontrola má hodnotu emulgačního indexu 60 % a její vrstva byla bílá a kompaktní. Nejblíže této hodnotě je kultura kultivovaná na kvasnicovém extraktu a glukóze jejíž emulgační index je 21,4 %. Jednalo se o bílou nekompaktní vrstvu. Nejnižší emulgační index mimo čistá média a negativní kontrolu má kultura na kvasnicovém extraktu a fruktóze, kdy se hodnota rovná 0,0 %. Vzhled vzorku byl taktéž podobný negativní kontrole, a to průhledné rozhraní dvou fází bez vzniklé emulze. Z tohoto testu tedy lze vyvodit, že bakterie je schopná produkce biosurfaktantů, nicméně produkce je silně závislá na kultivačních podmínkách.

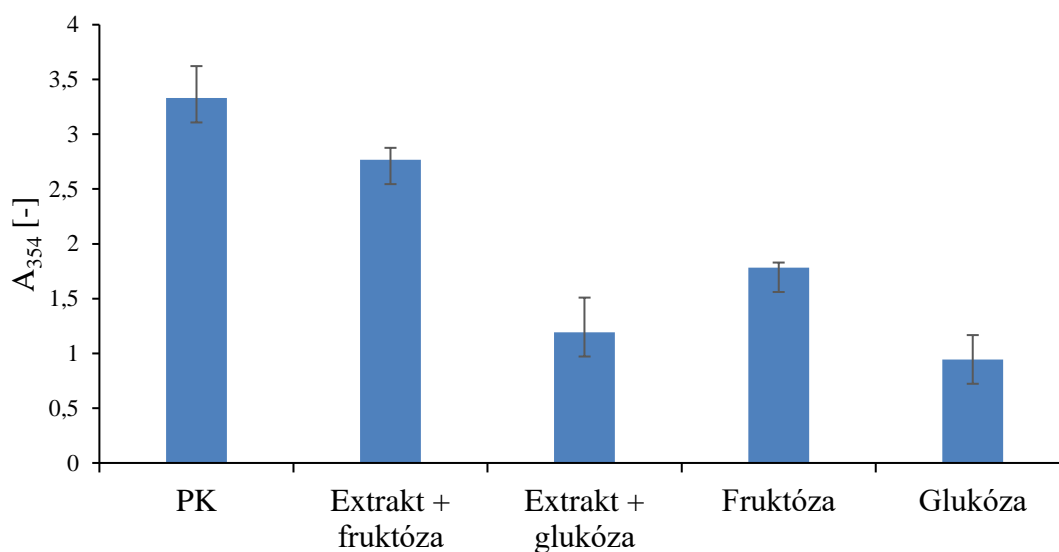


Obr. 15: Vybrané fotky vzniklých emulzí. 1 – pozitivní kontrola, 2 – extrakt + glukóza, 3 – fruktóza, 4 – glukóza, 5 – extrakt + fruktóza

Na Obr. 15 jsou viditelné vzniklé emulze. Vzhledem nejblíže k pozitivní kontrole je emulze vzniklá na fruktóze.

4.3.2 Solubilizace antracenu

Jedná se metodu zjištění přítomnosti biosurfaktantů a jejich koncentrace v závislosti na koncentraci antracenu. Antracen je látka v normálním vodném prostředí nerozpustná. Pokud roztok obsahuje biosurfaktanty, včlení se antracen do jádra micel. Vzorky byly centrifugovány, kdy se v případě nepřítomnosti biosurfaktantů krystaly antracenu usadily na dně a supernatant tedy měl nízkou hodnotu absorbance. V případě přítomnosti biosurfaktantů se při centrifugaci všechny krystaly antracenu neusadily a část jich zůstala v supernatantu, což se podepsalo na vyšší hodnotě absorbance. Množství antracenu v supernatantu tedy závisí na koncentraci biosurfaktantů. Jelikož samotnou solubilizaci může vykazovat i čisté médium, hodnota jeho absorbance byla odečtena od absorbance média se vzorkem. Vzorky byly připraveny podle kapitoly 3.4.7.2.



Obr. 16: Výsledné hodnoty absorbancí na jednotlivých substrátech

Z výsledků zobrazených na Obr. 16 můžeme usoudit, že bakterie je schopna produkovat určité množství biosurfaktantů na všech použitých substrátech. Hodnota absorbance pozitivní kontroly Triton X-100 je 3,33. Nejblíže tomuto číslu je substrát kvasnicového extraktu s fruktózou, který má hodnotu 2,767 a biosurfaktant tak produkuje ve značné koncentraci. Nejnížší hodnotu absorbance, a tudíž i nejnížší obsah biosurfaktantů v supernatantu byly zaznamenány na glukóze, a to 0,944.

4.3.3 Metoda Du-Nouy-Ring

Tato metoda je založena na měření povrchového napětí pomocí automatizovaného tenziometru. Byla měřena hodnota povrchového napětí čistého média a poté média se vzorky. Následně došlo ke srovnání o kolik bakterie v médiu ovlivnila hodnotu povrchového napětí. Jako hodnota prokazatelná pro tvorbu biosurfaktantů byla hodnota rovna nebo nižší 40 mN/m. Tento údaj je převzat ze článku od D. Cooper a spol. [34]. Měření probíhalo podle kapitoly 3.4.7.3.

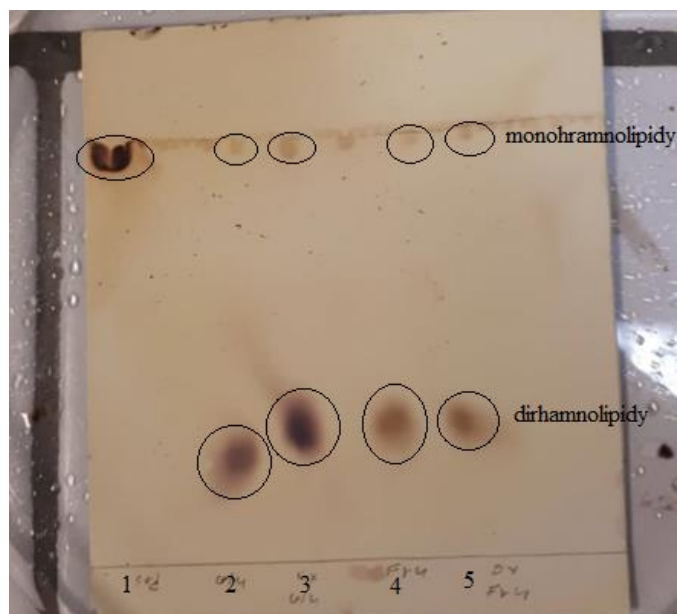
Tab. 7: Naměřené hodnoty povrchového napětí supernatantů a čistých médií na různých substrátech

Substrát	$\sigma_{\text{supernatant}}$ [mN/m]	$\sigma_{\text{čisté médium}}$ [mN/m]
Extrakt + fruktóza	37,588	55,670
Extrakt + glukóza	44,903	50,755
Fruktóza	46,263	59,947
Glukóza	52,072	53,788
PK	32,374	66,356

V Tab. 7 jsou zobrazeny výsledky povrchových napětí na jednotlivých substrátech u supernatantů a čistých médií. Z výsledků můžeme vidět, že bakterie dokázala snížit hodnotu povrchového napětí pod 40 mN/m pouze na substrátu kvasnicový extrakt s fruktózou. Bakterie tedy v tomto médiu prokazatelně tvoří biosurfaktanty. U substrátů kvasnicový extrakt s glukózou a fruktóza je snížení povrchového napětí také znatelné, ale ani v jednom případě se nedostalo pod hodnotu 40 mN/m. V obou případech však můžeme tvrdit, že bakterie i na těchto substrátech pravděpodobně v určitém množství biosurfaktanty produkují, jelikož rozdíl povrchového napětí supernatantu a čistého média je poměrně velký. Jediným případem, kde došlo pouze k zanedbatelné změně hodnoty, je při kultivaci na glukóze bez přídavku kvasničného extraktu. Zde se biosurfaktanty nenacházely. Glukóza byla pravděpodobně celkově nevhodný substrát pro náš kmen, jelikož na ní docházelo i k nejmenšímu nárůstu buněk napříč všemi experimenty.

4.3.4 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Metoda tenkovrstvé chromatografie je založena na rozdělení látky mezi stacionární a mobilní fázi. Jako stacionární fáze byla v našem případě použita hliníková destička pokrytá silikagelem. Mobilní fáze byla připravena podle kapitoly 3.3.4. Větší molekuly se při tomto rozdělování pohybují pomaleji a menší budou putovat delší vzdálenost. Experiment byl proveden podle postupu v kapitole 3.4.7.4.



Obr. 17: Výsledné rozdělení lipidů na monorhamnolipidy a dirhamnolipidy. 1 – standard, 2 – substrát glukózy, 3 – substrát kvasnicového extraktu a glukózy, 4 – substrát fruktózy, 5 – substrát kvasnicového extraktu a fruktózy

V tomto experimentu, jak můžeme vidět na Obr. 17, došlo k rozdělení vzorků na monorhamnolipidy a dirhamnolipidy. Podle intenzity frakce můžeme soudit, že je zde podstatně větší zastoupení dirhamnolipidů. Na obrázku také můžeme vidět, že u standardu došlo k rozdělení pouze na monorhamnolipidy, ovšem ze znalosti standardu víme, že obsahuje i dirhamnolipidy.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo prozkoumat potenciál termofilní bakterie *Pseudomonas thermotolerans* k produkci PHA a biosurfaktantů. V rámci experimentální části byla pomocí PCR testována přítomnost amplifikovaného genu *phaC1*, který je zodpovědný za syntézu mcl-PHA. Metoda potvrdila přítomnost genu, a tedy i predispozice bakterie k produkci polyhydroxyalkanoátů.

Byly optimalizovány podmínky růstu bakterie a produkce polyhydroxyalkanoátů. Nejprve byla testována vhodná minerální média. Jako vhodnější bylo zvoleno médium číslo 2, na kterém byl nárůst biomasy až 6x vyšší než na médiu číslo 1 a to 2,765 g/l. Následná plynová chromatografie s FID detekcí však neprokázala produkci PHA v žádném z médií.

Sledován byl nárůst biomasy a produkce při různých teplotách, při různých zdrojích uhlíku a za přidání různých prekurzorů. V experimentu byly testovány teploty 37, 45, 50, 55 a 60 °C. Nejlepší nárůst biomasy byl pozorován u teploty 45 °C. O něco menší nárůst byl při teplotě 37 °C. U teplot vyšších než 45 °C byla pozorována inhibice růstu buněk a tím úbytek biomasy, právě v důsledku vysoké teploty. Ani při změnách teploty nedošlo k produkci polyhydroxyalkanoátů. Z vybraných zdrojů uhlíku byl nárůst biomasy největší za použití kyseliny valerové a celkově na více uhlíkatých kyselinách a jejich solích. Nejméně vhodným zdrojem uhlíku byly monosacharidy, konkrétně glukóza.

V následujícím experimentu byl sledován vliv prekurzorů na produkci kopolymerů PHA. Jako prekurzory byly použity kyselina levulová, kyselina valerová a 1,4-butandiol. Největší nárůst biomasy byl pozorován po přidavku 1,4-butandiolu a to 1,33 g/l, avšak produkce kopolymeru nebyla zjištěna ani v jednom případě. Pro produkci mcl-PHA byly použity jako prekurzory oktanoát a dekanoát v různých koncentracích. Největší nárůst byl zaznamenán na oktanoátu v koncentraci 1 g/l a to 1,345 g/l. Ani v tomto případě nebyla prokázána produkce PHA. Dalším z testů bylo přidávání oktanoátu v koncentraci 1 g/l v různých časech. Důvodem bylo ponechání kultury více času na nárůst biomasy a tím následně zvýšit schopnost produkovat PHA. Největší nárůst biomasy byl v případě přidání prekurzoru v čas 0 h do média obsahujícího jako zdroj uhlíku glycerol. Kultivace v tomto případě probíhala po dobu 9 h a konečná koncentrace biomasy činila 0,58 g/l. Produkce polyhydroxyalkanoátů nebyla ani v tomto případě prokázána, a to vede k závěru, že i přes přítomnost genu PHA syntázy bakterie nebyla při našich experimentech schopna produkce polymeru.

Dále byla testována schopnost bakterie *Pseudomonas thermotolerans* produkovat biosurfaktanty. Za tímto účelem byly použity screeningové metody, a to stanovení emulgační aktivity, solubilizaci krystalického antracenu a metodu Du-Nouy-Ring. Z výsledků zmíněných metod je možné říci, že bakterie je schopna produkce biosurfaktantů. Prokazatelná produkce poklesnutím povrchového napětí pod hodnotu 40 mN/m byla zjištěna za použití substrátu kvasnicového extraktu a fruktózy. Hodnota povrchového napětí zde byla 37,588 mN/m. Proti tomu můžeme říci, že na glukóze bez přidavku kvasničného extraktu bakterie žádné biosurfaktanty neprodukuje. K bližšímu prozkoumání vlastností vzniklých biosurfaktantů byla

použita metoda chromatografie na tenké vrstvě. Podle našich výsledků bakterie produkuje jak monorhamnolipidy, tak dirhamnolipidy. Co se zastoupení týče, vzorky obsahovaly větší podíl dirhamnolipidů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WAKAI, Satoshi. Biochemical and thermodynamic analyses of energy conversion in extremophiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018, **83**(1), 49-64. DOI: 10.1080/09168451.2018.1538769. ISSN 0916-8451. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2018.1538769>
- [2] RAMPELOTTO, Pabulo. Extremophiles and Extreme Environments. *Life*. 2013, **3**(3), 482-485. DOI: 10.3390/life3030482. ISSN 2075-1729. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2075-1729/3/3/482>
- [3] SATYANARAYANA, Tulasi, Jennifer LITTLECHILD a Yutaka KAWARABAYASI. *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: biotechnology of thermophiles*. Second edition. Dordrecht: Springer, [2013]. ISBN 978-94-007-5899-5.
- [4] BERGEY, David Hendrick. Thermophilic Bacteria. *J Bacteriol*. 1919, **4**(4), 301-306.
- [5] ZEIKUS, J. Gregory. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*. 1979, **1**(4), 243-252. DOI: 10.1016/0141-0229(79)90043-7. ISSN 01410229. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022979900437>
- [6] ISIDOROV, V.A., I. G. ZENKEVICH a B. V. IOFFE. Volatile organic compounds in solfataric gases. *Journal of Atmospheric Chemistry*. Nizozemsko: Kluwer Academic Publishers, 1990, **10**(3), 329-340. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00053867>. ISSN 0167-7764.
- [7] VAN DOVER, Cindy. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. 1. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 2000. ISBN 06-910-4929-7.
- [8] STETTER, K. O., et al. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*. 1993, **365**(6448), 743-745. DOI: 10.1038/365743a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/365743a0>
- [9] TORSVIK, Vigdis, et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*. 1998, **64**(1), 53-62. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00103-5. ISSN 01681656. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165698001035>
- [10] MADIGAN, Michael T a Aharon ORENT. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, **2**(3), 265-269. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80046-0. ISSN 13695274. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800460>
- [11] AMEND, Jan P. a Everett L. SHOCK. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*.

- 2001, **25**(2), 175-243. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00576.x. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00576.x>
- [12] MONTIE, Thomas C. *Pseudomonas*. 10. New York: Plenum Press New York, 1998. ISBN 978-1-4899-0122-4
- [13] MANAIA, C. M. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2002, **52**(6), 2203-2209. DOI: 10.1099/ijs.0.02059-0. ISSN 14665026. Dostupné také z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02059-0>
- [14] *Pseudomonas*. In: *Diversey* [online]. Amsterdam [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <http://solutionsdesignedforhealthcare.com/pseudomonas-prevention>
- [15] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [16] OBRUCA, S., et al. Use of Controlled Exogenous Stress for Improvement of Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online], 2010, **55**(1), s. 17-22. ISSN: 0015-5632.
- [17] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 2014, **6**(3), 706-754. DOI: 10.3390/polym6030706. ISSN 2073-4360. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706>
- [18] MADISON, L. L. a G. W HUISMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999, **63**(1), 21-53.
- [19] JIANG, X., J. A. RAMSAY a B. A. RAMSAY. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, **67**(2), 212-219. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.03.015. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206000856>
- [20] C.S.K. REDDY, C.S.K., et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, **87**(2), 137–146. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2).

- [21] REDDY, C.S.K. a et al. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, **31**(2), 55-67. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841X. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>
- [22] VERLINDEN, R.A.J., et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, **102**(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>.
- [23] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. 2002, **56**(1), 403-432. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838. ISSN 0066-4227. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- [24] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications*. 2018, **126**, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [25] PORTER, M.M. a et al. Porous Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Fabricated by a Novel Method Via Centrifugation. *Mechanics of Biological Systems and Materials, Volume 5*. New York, NY: Springer New York, 2013, 2013-9-10, , 63-71. Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series. DOI: 10.1007/978-1-4614-4427-5_10. ISBN 978-1-4614-4426-8. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4427-5_10
- [26] POUTON, Colin W. a Saghir AKHTAR. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996, **18**(2), 133-162. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00092-L. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169409X9500092L>
- [27] GEYS, Robin, Wim SOETAERT a Inge VAN BOGAERT. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, **30**, 66-72. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.002. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001049>
- [28] KNEPPER, Thomas P. a José Luis BERNA. Chapter 1 Surfactants: Properties, production, and environmental Aspects. *Analysis and Fate of Surfactants and the Aquatic Environment*. Elsevier, 2003, 2003, , 1-49. Comprehensive Analytical Chemistry. DOI: 10.1016/S0166-526X(03)40004-4. ISBN 9780444509352. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166526X03400044>
- [29] SILVA, Rita, et al. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(7),

12523-12542. DOI: 10.3390/ijms150712523. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/7/12523>

- [30] PACWA-PŁOCINICZAK, Magdalena, et al. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, **12**(1), 633-654. DOI: 10.3390/ijms12010633. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/1/633>
- [31] MÜLLER, Markus Michael a Rudolf HAUSMANN. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **91**(2), 251-264. DOI: 10.1007/s00253-011-3368-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3368-2>
- [32] SANTOS, Danyelle, et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(3). DOI: 10.3390/ijms17030401. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/401>
- [33] HAMLEY, Ian W. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*. 2015, **51**(41), 8574-8583. DOI: 10.1039/C5CC01535A. ISSN 1359-7345. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CC01535A>
- [34] COOPER, David G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*. 1986, **3**(5), 145-9
- [35] SATOH, Y., et al. Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, **111**(4), 811-817. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x>
- [36] ABDEL-MAWGOUD, Ahmad Mohammad, François LÉPINE a Eric DÉZIEL. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **86**(5), 1323-1336. DOI: 10.1007/s00253-010-2498-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA – polyhydroxyalkanoáty

mcl-PHA – medium-chain-length PHA

PCR – polymerázová řetězová reakce

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

DNA – deoxyribonukleová kyselina

scl-PHA – short-chain-length PHA

TBE – *tris*-borát-EDTA

PHB – poly(3-hydroxybutyrát)

PHBV – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FID – detekce s plamenovou ionizací (Flame ionization detection)

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

např. – například

ΔA – rozdíl absorbancí

E_{24} – emulgační index

h_{emulze} – výška emulgační vrstvy

h_{tot} – celková výška kapaliny

σ – povrchové napětí